

Alterungsabhängige Veränderungen retinaler Mikroglia nach pharmakologischer Depletion und Regeneration im Mausmodell

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

**Vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Valerie Justin Scherwietes

geboren am 04.06.1993 in Gladbeck

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Otto W. Witte
Hans-Berger-Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. Daniel Meller
Klinik für Augenheilkunde, Universitätsklinikum Jena
3. Prof. Dr. med. Christoph Redecker
Klinik für Neurologie, Klinikum Lippe-Lemgo

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.10.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung.....	2
2.1 Definition und Ursprung der Mikroglia im ZNS.....	2
2.2 Funktionen der Mikroglia	4
2.2.1 Amöboide Mikroglia	4
2.2.2 Verzweigte (ramifizierte) Mikroglia in der Homöostase des ZNS.....	4
2.2.3 Reaktive Mikroglia	6
2.3 Aufbau der Retina	8
2.4 Retinale Mikroglia.....	10
2.5 Mikrogliale Veränderung im Alter und dystrophe Mikroglia	12
2.6 CSF1R-Inhibitor PLX5622 – Mittel zur mikroglialen Depletion <i>in situ</i>	15
3 Ziele der Arbeit.....	16
4 Material	17
4.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial	17
4.2 Chemikalien	18
4.3 Tierfutter.....	19
4.4 Antikörper.....	19
4.5 Lösungen und Puffer	19
4.6 Primer-Sequenzen	20
4.7 Kits.....	20
4.8 Software.....	21
5 Methodik	22
5.1 Experimentelles Design.....	22
5.1.1 Kontrollgruppen	23
5.1.2 Depletionsgruppen - PLX5622 behandelte Tiere.....	23
5.1.3 Regenerationsgruppen	23
5.2 Gewebegewinnung.....	23
5.3 Immunhistochemische Färbung.....	25
5.4 Morphologische Analyse der retinalen Mikroglia.....	27

5.5 RNA-Isolierung	29
5.6 cDNA-Synthese	30
5.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	31
6 Ergebnisse	33
6.1 Anzahl und Verteilung der Mikroglia in den Retinae junger und alter Mäuse	33
6.1.1 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia	34
6.1.2 Wirkung von PLX5622 auf die Anzahl der Mikroglia	34
6.1.3 Beurteilung der mikroglialen Regeneration	35
6.2 Morphologische Analyse der jungen und alten retinalen Mikroglia	37
6.2.1 Allgemeiner Vergleich der Regionen	37
6.2.2 Zentralregion	39
6.2.2.1 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia	39
6.2.2.2 Charakterisierung der nicht depletierten Zellen	41
6.2.2.3 Charakterisierung der regenerierten Mikroglia	43
6.2.3 Peripherie	45
6.2.3.1 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia	45
6.2.3.2 Charakterisierung der nicht depletierten Zellen	47
6.2.3.3 Charakterisierung der regenerierten Mikroglia	49
6.2.4 Vergleich Zentralregion zu Peripherie innerhalb jeder Behandlungsgruppe	50
6.2.4.1 Junge Depletionsgruppe	50
6.2.4.2 Junge Regenerationsgruppe	50
6.2.4.3 Alte Regenerationsgruppe	52
6.3 Genexpressionsanalyse in den Retinae junger und alter Mäuse	54
6.3.1 Alterungsabhängiger Effekt	54
6.3.1.1 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α	54
6.3.1.2 Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	55
6.3.1.3 Expression des Phagozytosemarkers CD68	55
6.3.1.4 Expression der Seneszenzmarker p16, p21 und p53	56
6.3.2 Auswirkung der mikroglialen Depletion	56
6.3.2.1 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α	56
6.3.2.2 Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	57
6.3.2.3 Expression des Phagozytosemarkers CD68	58
6.3.2.4 Expression der Seneszenzmarker p16, p21 und p53	58
6.3.3 Auswirkung der Regeneration der Mikroglia population	58
6.3.3.1 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α	59
6.3.3.2 Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10	59
6.3.3.3 Expression des Phagozytosemarkers CD68	60
6.3.3.4 Expression der Seneszenzmarker p16, p21 und p53	60

7	Diskussion	61
7.1	Vergleich der Anzahl und Verteilung der retinalen Mikroglia im Alter und bei mikroglialer Depletion und Regeneration	61
7.1.1	Auswertung der verwendeten Retinaschnitte	61
7.1.2	Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia	62
7.1.3	Einfluss von CSF1R-Inhibitor PLX5622 auf die Mikroglia im Alter	62
7.1.4	Charakterisierung der mikroglialen Regeneration	63
7.2	Morphologische Analyse der jungen und alten retinalen Mikroglia.....	64
7.2.1	Alterungsabhängige morphologische Unterschiede der Mikroglia ohne Vorhandensein dystropher Zellen	65
7.2.2	Charakterisierung der nicht depletierten Mikroglia	67
7.2.3	Charakterisierung der regenerierten Mikroglia	68
7.3	Analyse der Genexpression in jungen und alten Mausretinae	73
7.3.1	Alterungsabhängige Veränderungen in der retinalen Genexpression.....	74
7.3.2	Auswirkung der mikroglialen Depletion auf die retinale Genexpression	75
7.3.3	Auswirkung der mikroglialen Regeneration auf die retinale Genexpression	77
8	Schlussfolgerungen.....	80
9	Literatur- und Quellenverzeichnis	82
10	Anhang.....	96
	Abbildungsverzeichnis	96
	Tabellenverzeichnis	97
	Ehrenwörtliche Erklärung	98
	Danksagung.....	99

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
<i>g</i>	mittlere Erdbeschleunigung
nm	Nanometer
µm	Mikrometer
µm ²	Quadratmikrometer
µm ³	Kubikmikrometer
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
g	Gramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µM	mikromolar
mM	millimolar
M	molar
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BG	choroidale Blutgefäße
BSA	<i>bovine serum albumine</i> (Rinderserumalbumin)
C57BL/6Jena	Subkolonie des Stammes C57BL/6 aus der Klinik für Neurologie Jena
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> (Cyclin-abhängige Kinase)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CR3	<i>complement receptor 3</i> (Komplement-Rezeptor 3)
CSF1	<i>colony-stimulating factor 1</i>
CSF1R	<i>colony-stimulating factor 1 receptor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAMP	<i>damage-associated molecular patterns</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol Dihydrochlorid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

E	Embryonaltag
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GCL	<i>ganglion cell layer</i> (Ganglienzellschicht, lat. <i>Stratum ganglionare fasciculi optici</i>)
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> (saures Gliafaserprotein)
Iba1	<i>ionized calcium-binding adaptor molecule 1</i>
IL	Interleukin
INL	<i>inner nuclear layer</i> (Innere Körnerschicht, lat. <i>Stratum nucleare internum</i>)
IPL	<i>inner plexiform layer</i> (Innere plexiforme Schicht, lat. <i>Stratum plexiforme internum</i>)
LSM	<i>Laser scanning microscope</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätsantigen)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NDS	<i>normal donkey serum</i> (Normales Eselserum)
NFL	<i>nerve fiber layer</i> (Nervenfaserschicht)
NGF	<i>nerve growth factor</i> (Nervenwachstumsfaktor)
ON	optischer Nerv
ONL	<i>outer nuclear layer</i> (Äußere Körnerschicht, lat. <i>Stratum nucleare externum</i>)
OPL	<i>outer plexiform layer</i> (Äußere plexiforme Schicht, lat. <i>Stratum plexiforme externum</i>)
OT	Objektträger
p16	p16 ^{Ink4a} , Zellzyklusregulator, Tumorsuppressor
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> (pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Normalsalzlösung)
PFA	Paraformaldehyd
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
qPCR	<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
RIS	<i>RNA-Integrity Score</i>

RNA	<i>ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
RPE	retinales Pigmentepithel
SASP	<i>senescence-associated secretory phenotype</i>
SEM	<i>standard error of the mean</i> (Standardfehler des arithmetischen Mittels)
SASP	<i>senescence-associated secretory phenotype</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TLV	Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TREM2	<i>triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
UV	Ultraviolettstrahlung
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Zusammenfassung

Zunehmend werden Mikroglia mit neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Retina assoziiert sowie ihre altersbedingten Veränderungen mit einer verringerten neuroprotektiven Funktion und einer vermehrten Neurotoxizität in Verbindung gebracht. Die Auswirkungen der mikroglialen Veränderungen in der gesunden Alterung sind deshalb von zentraler Bedeutung, um ihren Beitrag in neurodegenerativen Erkrankungen zu verstehen. Weiterhin stellt der Einsatz des CSF1R-Inhibitors PLX5622 eine mögliche Therapiestrategie dar, um altersveränderte Mikroglia pharmakologisch zu entfernen und durch neue, möglicherweise verjüngte, Mikroglia zu ersetzen. Ziel der durchgeführten Untersuchung war daher, alterungsabhängige Veränderungen von Mikroglia sowie die Auswirkung einer mikroglialen Depletion und Regeneration in der Retina junger adulter und alter Mäuse zu ermitteln. Hierfür wurde die mikrogliale Anzahl und Verteilung in den Retinaschichten, die mikrogliale Morphologie sowie die Genexpression der Retina untersucht. Da der Ursprung der regenerierten Mikroglia bisher nicht vollständig geklärt ist, aber je nach Region möglicherweise aus zwei verschiedenen Quellen stammt, erfolgte eine regionsspezifische morphologische Analyse.

Insgesamt konnte kein alterungsabhängiger Unterschied zwischen jungen und alten retinalen Mikroglia aufgezeigt werden. Die pharmakologische Depletion der Mikroglia durch PLX5622 bewirkte in beiden Altersgruppen eine 84 %-ige Entfernung der Mikroglia, das Absetzen eine gesteigerte Proliferation dieser Zellen. In der morphologischen Analyse zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Regionen, ein verjüngter Phänotyp der regenerierten Mikroglia konnte dagegen nicht belegt werden. Die Genexpressionsanalyse wies vereinzelte signifikante Unterschiede in den Seneszenzmarkern p16 und p53 auf, während eine erhöhte Inflammation im Alter und nach Regeneration ausblieb.

Weitere Erkenntnisse über die verschiedenen Funktionen und Ursprünge der retinalen Mikroglia werden benötigt, um die mikrogliale Rolle in Pathologien der Retina sowie des ZNS im Alter zu verstehen. Ebenso ist eine Charakterisierung der Mikroumgebung der Retina von Bedeutung, da diese einen erheblichen Beitrag zur Funktion und Anpassung der Mikroglia leistet.

2 Einleitung

Alterung gilt als höchster Risikofaktor für viele neurodegenerative Erkrankungen und geht mit einer Abnahme neuronaler Funktionen durch zelluläre und molekulare Veränderungen im zentralen Nervensystem (ZNS) einher. So werden alterungsabhängige Veränderungen in Gliazellen mit einer verringerten neuroprotektiven Funktion und einer vermehrten Neurotoxizität in Verbindung gebracht. Dabei werden insbesondere Mikroglia mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit und dem Parkinson-Syndrom assoziiert (Luo et al. 2010, Saijo und Glass 2011, Tremblay et al. 2012, Streit et al. 2014). Auch in ausgelagerten ZNS-Bereichen wie der Retina konnte ein Zusammenhang von Mikroglia mit der Pathogenese der altersbedingten Makuladegeneration, des Glaukoms und der diabetischen Retinopathie aufgezeigt werden (Karlstetter et al. 2015, Silverman und Wong 2018). Die Auswirkungen mikroglialer Veränderungen in der gesunden Alterung sind deshalb von zentraler Bedeutung, um ihren Beitrag in neurodegenerativen Erkrankungen zu verstehen und therapeutische Strategien zu entwickeln.

2.1 Definition und Ursprung der Mikroglia im ZNS

Mikroglia sind die primären Immunzellen des Gehirns. Ihre Verteilung erstreckt sich über das gesamte ZNS-Parenchym (Chan et al. 2007). Im adulten Mausgehirn unterscheidet sich ihre Dichte innerhalb der anatomischen Regionen und reicht von 5 % im Kortex bis zu 12 % in der *Substantia nigra* (Lawson et al. 1990). Auch im menschlichen Gehirn entsprechen Mikroglia 0,5 bis 16,6 % der totalen Population der Gehirnzellen und weisen eine ähnliche regionale Variabilität auf wie im Mausgehirn (Mittelbronn et al. 2001).

Im Gegensatz zu Makrogliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten) mit neuroektodermaler Herkunft (Bayraktar et al. 2014, Bergles und Richardson 2015, Crawford et al. 2016) wird der ontogenetische Ursprung der Mikroglia bis heute kontrovers diskutiert (Kaur et al. 2001, Rezaie und Male 2002, Chan et al. 2007, Prinz et al. 2019). Im Jahr 1919 beschrieb Pío del Río-Hortega zum ersten Mal Mikroglia als migratorische und phagozytotische Zellen mesodermalen Ursprungs, während er den Oligodendrozyten einen ektodermalen Ursprung zuschrieb (Del Río-Hortega 1939, Ransohoff und Cardona 2010, Perez-Cerda et al. 2015, Sierra et al. 2016). Seitdem

gibt es divergierende Ansichten über die Herkunft der Mikroglia. Einige Autoren nehmen einen neuroektodermalen Ursprung durch eine Abstammung von freien subependymalen Zellen oder Glioblasten des lateralen Ventrikels an (Lewis 1968, Paterson et al. 1973, Kitamura et al. 1984, Rezaie und Male 2002). Eine andere Theorie beschreibt die myeloische Abstammung. Demnach stammen amöboide Mikroglia in der perinatalen Entwicklungsphase von zirkulierenden hämatopoetischen Stammzellen ab, welche über Blutgefäße ins Gehirn einwandern. Es konnten sowohl verschiedene Makrophagen- und Monozyten-spezifische Antikörper auf Mikroglia sowie die Transformation einer amöboiden zu einer verzweigten mikroglialen Morphologie nachgewiesen werden (Ling et al. 1980, Ling und Wong 1993, Kaur et al. 2001). Die myeloischen Zellen tragen zur mikroglialen Homöostase und Funktion bei. Studien zeigen, dass derartige Zellen nur unter bestimmten pathologischen Bedingungen ins ZNS migrieren und sich zu Mikroglia umwandeln (Flugel et al. 2001). Sie weisen jedoch funktionelle Unterschiede zu endogenen Mikroglia auf (Simard und Rivest 2004, Simard et al. 2006, Mildner et al. 2011).

Neuere Studien zeigen, dass Mikroglia einer einzigen Welle erythromyeloider Vorläuferzellen entstammen, welche sich in der Maus um den achten Embryonaltag (E8.0) im Dottersack bilden (Alliot et al. 1999, Ginhoux et al. 2010, Kierdorf et al. 2013). Zwischen E8.5 und E9.5 migrieren diese Vorläuferzellen in das ZNS, wo sie sich zu Mikroglia differenzieren (Ginhoux et al. 2010, Kierdorf et al. 2013, Gomez Perdiguero et al. 2015). Diese frühe embryonale Mikrogliapopulation breitet sich fortan ohne weitere Mitwirkung myeloischer Vorläuferzellen durch Proliferation aus (Alliot et al. 1999, Ajami et al. 2007, Ginhoux et al. 2010, Schulz et al. 2012, Gomez Perdiguero et al. 2015). Die Zelldichte der Mikroglia bleibt in jungen und alten Gehirnen sowohl von Mäusen als auch von Menschen stabil (Askew et al. 2017). Diese Stabilität wird durch ein konstantes Remodeling erreicht, das auf zeitlicher und räumlicher Koppelung von Proliferation und Apoptose basiert und somit einen Mechanismus der lebenslangen Homöostase darstellt (Askew et al. 2017). Im Gegensatz zu anderen Immunzellen haben Mikroglia einen langsamen Zellaustausch mit einer Rate von etwa 1 % pro Woche (Lawson et al. 1992, Shankaran et al. 2007). Studien im Mausgehirn zeigten eine Variabilität der Selbsterneuerung in unterschiedlichen Gehirnkompartmenten mit Zellaustauschraten von drei (Askew et al. 2017) bis 41 Monaten (Tay et al. 2017b). Im menschlichen Gehirn konnten sogar Raten von Jahren bis Jahrzehnte nachgewiesen werden (Reu et al. 2017). Dennoch bedeutet dies, dass ein Teil der Population

während der Lebensdauer eines Organismus etliche Zyklen der Selbsterneuerung durchläuft (Askew et al. 2017), während ein anderer Teil über eine lange Zeit der Lebensspanne des Organismus als langlebige Zellen erhalten bleibt (Fuger et al. 2017). Die Homöostase aus Proliferation und Apoptose bewirkt eine dynamische Reorganisation und kann auf die Funktion der Mikroglia Einfluss nehmen.

2.2 Funktionen der Mikroglia

Mikroglia werden als die Immunzellen des ZNS betrachtet (Hanisch und Kettenmann 2007). Es handelt sich jedoch nicht um einen einheitlichen Zelltyp. Mikroglia weisen über alle Entwicklungsphasen und Altersstufen unterschiedliche Funktionszustände auf und damit einhergehend eine Vielzahl an Eigenschaften und Aufgaben in der Entwicklung, Funktion und Reparatur des ZNS (Kettenmann et al. 2011, Tay et al. 2017a). Anhand dieser Eigenschaften lassen sich mehrere Unterformen von Mikroglia unterscheiden: amöboide, ramifizierte und reaktive Mikroglia.

2.2.1 Amöboide Mikroglia

Während der fetalen und postnatalen Entwicklung haben Mikroglia eine amöboide Morphologie. Es handelt sich dabei um große, flache und abgerundete Zellen mit nur wenigen Zellfortsätzen (Davis et al. 1994). Sie besitzen die Fähigkeit zur Proliferation, Migration und Phagozytose (Brockhaus et al. 1996). Amöboide Mikroglia wandern in das Hirnparenchym ein und gehen in eine verzweigte Morphologie über. Hirnregionen in der Nähe zu Blutgefäßen weisen als erstes verzweigte Mikroglia auf. Nach 15 Tagen postnatal sind alle Mikroglia in eine verzweigte Form übergegangen (Walker et al. 2014).

2.2.2 Verzweigte (ramifizierte) Mikroglia in der Homöostase des ZNS

Im stabilen Zustand weisen Mikroglia einen Phänotyp auf, der durch zahlreiche lange, feine und weitverzweigte Zellfortsätze charakterisiert ist und deshalb auch als ramifiziert bezeichnet wird (Davis et al. 1994, Raivich et al. 1999). Sie besitzen einen kleinen (5-10 µm) ovalen Zellkörper, der fast vollständig vom Zellkern ausgefüllt wird (Davis et al. 1994). Dieser Zustand der Mikroglia ist für eine aktive und kontinuierliche Überwachung des Hirnparenchyms in ihrer Mikroumgebung zuständig und wirkt somit neuroprotektiv (Davalos et al. 2005, Nimmerjahn et al. 2005). In der Vergangenheit

wurde dieser Phänotyp mit einem ruhenden, inaktiven Zustand gleichgesetzt (Hanisch und Kettenmann 2007). Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass sich diese Form der Mikroglia durch eine hohe dynamische Motilität ihrer Fortsätze und Zellvorwölbungen auszeichnet, die den gesamten ZNS-Extrazellulärraum innerhalb weniger Stunden abtasten und dynamisch mit Astrozyten, Neuronen und Blutgefäßen interagieren (Nimmerjahn et al. 2005). Im gesunden ZNS weist die Mikrogliapopulation eine mosaikähnliche Organisation auf. Sie bilden Territorien von 30-40 µm Durchmesser (Raivich et al. 1999), in denen Kontakte zwischen Zellfortsätzen individueller Zellen gemieden werden (Nimmerjahn et al. 2005, Jinno et al. 2007).

Mikroglia zeigen über die verschiedenen Hirnareale und Altersstufen eine Vielzahl an Funktionen auf (Tay et al. 2017a). In Abbildung 1 sind einige dieser Funktionen dargestellt. Bereits während der Entwicklung des Nervensystems sind sie in die Phagozytose apoptotischer Neurone involviert, welche sich im Übermaß während der normalen Hirnentwicklung sowie der anhaltenden Neurogenese im adulten Gehirn gebildet haben (Marin-Teva et al. 2004, Sierra et al. 2010, Brown und Neher 2014). Sie können Apoptose in Neuronen auslösen oder lebende Neurone phagozytieren (Brown und Neher 2014, Salter und Stevens 2017). Gleichzeitig unterstützen sie das neuronale Überleben (Ueno et al. 2013), das axonale Wachstum (Squarzoni et al. 2014) und fördern und phagozytieren Synapsen (*synaptic pruning*) (Paolicelli et al. 2011, Schafer et al. 2012, Parkhurst et al. 2013). Im adulten Gehirn konnte gezeigt werden, dass mikrogliale Zellfortsätze flüchtige Verbindungen mit neuronalen prä- und postsynaptischen Elementen, dem synaptischen Spalt und perisynaptischen Astrozyten aufnehmen, diese überwachen und auf Änderungen neuronaler Aktivität und Neurotransmitterfreisetzung reagieren (Wake et al. 2009, Tremblay et al. 2010, Miyamoto et al. 2013).

Dadurch sind sie auch in kognitiven Prozessen wie dem Lernen, Gedächtnis und der Plastizität des Gehirns eingebunden. Insbesondere in Lernprozessen fördern sie aktivitätsabhängig die Bildung und den Umbau von Synapsen (Parkhurst et al. 2013). Sie können Neurone nicht nur durch direkten Kontakt, sondern auch über bidirektionale parakrine Signalwege modulieren und regulieren (Rogers et al. 2011, Li et al. 2012, Schafer et al. 2013).

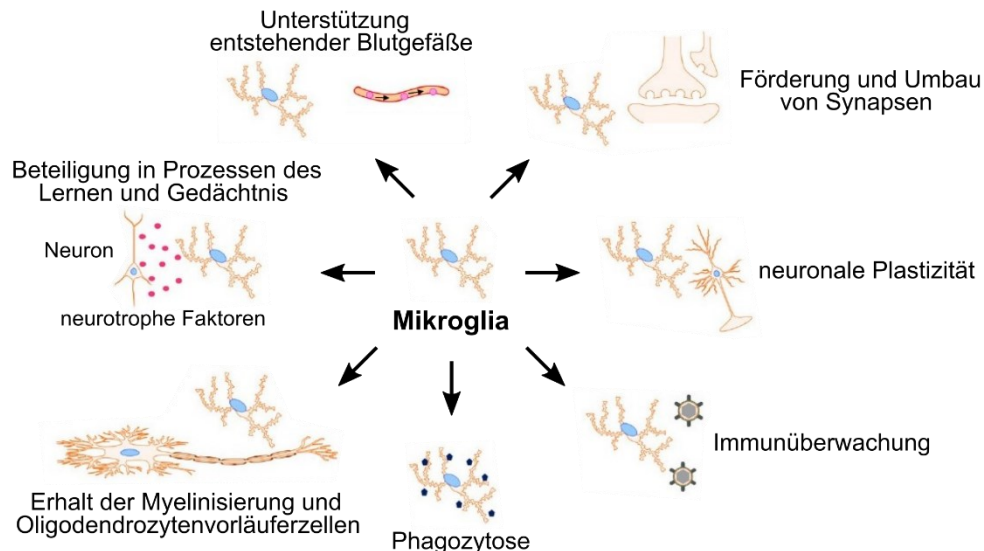


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der vielfältigen Funktionen von Mikroglia. Modifiziert nach (Han et al. 2019).

Gleichzeitig weisen Mikroglia Rezeptoren für Zytokine, Chemokine und Neurotransmitter auf, sodass eine gegenseitige Beeinflussung zwischen Mikroglia und Neuronen sowie anderen Gliazellen besteht (Banati 2003, Biber et al. 2007, Pocock und Kettenmann 2007, Kierdorf und Prinz 2013). Mikroglia sind somit sowohl im neugeborenen wie im adulten ZNS maßgeblich an der Plastizität und Funktion des neuronalen Netzwerks beteiligt (Karlstetter et al. 2015).

2.2.3 Reaktive Mikroglia

Bei der Wahrnehmung geringster pathologischer Veränderungen in ihrem extrazellulären Milieu ändern Mikroglia ihren Aktivierungszustand, meist vor der Reaktion anderer Zelltypen (Kreutzberg 1996). Solche Veränderungen beinhalten Schädigungen des ZNS wie Traumata, Ischämien, Entzündungen, Infektionen, Tumoren oder neurodegenerative Erkrankungen, aber auch homöostatische Veränderungen. Dabei gibt es nicht nur einen bestimmten Aktivierungszustand, sondern eine Diversität an Funktionszuständen, die abhängig von Stimuli, ihrer Intensität und dem Gesamtzusammenhang sind (Hanisch und Kettenmann 2007). Einhergehend mit der Aktivierung kommt es zu einer morphologischen Veränderung. Der Zellkörper bekommt ein größeres zytoplasmatisches Volumen und die Fortsätze bilden sich zurück, bis sie vollständig im Zellkörper absorbiert werden. Statt ihrer bekommt die Zelle wenige neue, dynamischere Zellfortsätze, die schneller wachsen und zurückgebildet werden als solche im ruhenden Zustand. Die neuen Fortsätze sind

kräftiger und haben zum Teil eine becherartige Form, mit der sie andere Zellen kontaktieren oder sie phagozytieren. Zusätzlich kommt es zur schnellen und zielgerichteten Ausrichtung der Zellfortsätze und zur Migration der Zellen zum Ort der Schädigung sowohl bei einer Verletzung des Hirnparenchyms (Nimmerjahn et al. 2005) als auch als Antwort auf extrazelluläres, von Astrozyten ausgeschüttetes ATP (Davalos et al. 2005, Haynes et al. 2006). Mit einem Wechsel ihres Aktivierungszustandes erlangen Mikroglia die Fähigkeit der Migration, Phagozytose und Proliferation und ähneln der amöboiden Form der Perinatalzeit (Raivich et al. 1999, Stence et al. 2001). Die Art und Weise der mikroglialen Transformation und die Bestimmung einzelner Zwischenstadien der Aktivierung ist noch Gegenstand der Forschung (Walker et al. 2014, Stopper et al. 2018).

Darüber hinaus kommt es zur Veränderung des Immunphänotyps durch verstärkte oder *de novo* Expression diverser Rezeptoren und Antigene. Hierzu zählen *pattern-recognition-receptors* (PRRs), insbesondere *Toll-like receptors* (TLRs) und Komplementrezeptor 3 (*complement receptor 3*, CR3), die pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPS) erkennen und Mikroglia befähigen, auf Mikroorganismen wie Bakterien und Viren zu reagieren. Auch führt es zur Expression von *major histocompatibility complex* (MHC) I und II (Haupthistokompatibilitätsantigenen) sowie zur Umwandlung in eine antigenpräsentierende Zelle (Raivich et al. 1999, Aloisi 2001, Olson und Miller 2004). Mikroglia repräsentieren dadurch die erste Instanz der Abwehr invadierender Pathogene und lösen sowohl eine angeborene als auch eine adaptive Immunantwort aus (Olson und Miller 2004).

Zusätzlich zur Pathogenabwehr können Mikroglia durch diese Rezeptoren auch endogene *damage-associated molecular patterns* (DAMPs) erkennen (Saijo und Glass 2011). DAMPs umfassen endogene Moleküle, die unter zellulärem Stress oder Schädigung sterbender Zellen ausgeschüttet werden und eine sterile Inflammation triggern können (Chen und Nunez 2010). Dies dient der Aufnahme akkumulierter Metabolite und Zelltrümmer und sorgt für die Gewebereparatur des Hirnparenchyms (Nimmerjahn et al. 2005, Saijo und Glass 2011). Die Aktivierung der Rezeptoren führt zudem zu einer gesteigerten Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, durch welche Mikroglia ihre Effektorfunktion in der adaptiven Immunantwort und ihre immunmodulatorische Funktion offenbaren (Aloisi 2001, Olson und Miller 2004,

Hanisch und Kettenmann 2007). Dazu gehören unter anderem proinflammatorische Interleukine (IL-1 β , IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Proteasen, Stickstoffmonoxid und reaktive Sauerstoffspezies (Banati et al. 1993, Aloisi 2001, Colton und Wilcock 2010). Daneben setzen Mikroglia auch antiinflammatorische Mediatoren wie *Transforming growth factor- β* (TGF- β) und Interleukin-10 (IL-10) frei und exprimieren neurotrophe Faktoren wie *nerve growth factor* (NGF) und *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), mit denen sie Neurone und Gliazellen unterstützen und zur adulten Neurogenese und Gewebeerhaltung beitragen (Elkabes et al. 1996, Hanisch und Kettenmann 2007, Kierdorf und Prinz 2017).

Aufgrund ihrer Phagozytoseaktivität und der Freisetzung zytotoxischer wie trophischer Faktoren, weisen Mikroglia sowohl eine neuroprotektive als auch eine neurotoxische Wirkung auf. Neben ihrer Immunfunktion verfügen Mikroglia zudem über regulatorische und modulierende Funktionen zum Erhalt des neuronalen Netzwerks (Hanisch und Kettenmann 2007, Neumann et al. 2009).

2.3 Aufbau der Retina

Während der Embryonalentwicklung entstehen die Netzhaut (Retina) und der optische Nerv aus einer Ausstülpung des Prosenzephalons und sind somit aufgrund ihrer neuroektodermalen Herkunft und Abstammung vom anterioren Neuralrohr ein Teil des ZNS. Die Retina besteht aus einem hochspezialisierten neuronalen Gewebe, welches die visuellen Informationen generiert und diese zum ZNS übermittelt (Ulfing 2009). Der schematische Aufbau der Retina ist in Abbildung 2 dargestellt. Strukturell können in der Retina zehn verschiedene Schichten unterschieden werden. Drei dieser Schichten werden durch die Zellkerne der retinalen Neurone gebildet, die restlichen beinhalten die Fortsätze und Synapsen dieser Zellen. Die sensorische Komponente der Retina für die Lichtwahrnehmung und Reizweiterleitung beinhaltet zwei Arten von Photorezeptoren, den Stäbchen und Zapfen. Die menschliche Retina enthält etwa 5-6 Millionen Zapfen, die vor allem in der *Fovea centralis*, dem Ort des schärfsten Sehens, lokalisiert sind und dem photopischen Sehen dienen. Dagegen dienen die etwa 100-120 Millionen Stäbchen dem skotopischen Sehen und sind mit Ausnahme der *Fovea centralis* über die gesamte Retina verteilt (Curcio et al. 1990, Trepel 2008, Eysel 2010). Die äußeren Segmente der Photorezeptoren befinden sich in der äußersten Retinaschicht, dem retinalen Pigmentepithel (RPE). Das RPE stellt die Verbindung der

Retina mit der Aderhaut (Choroidea) her und ist an der ständigen Regeneration des Sehpigments beteiligt. Die Zellkerne der Photorezeptoren liegen in der äußeren Körnerzellschicht (ONL, *outer nuclear layer*). Die Photorezeptoren wandeln die optischen Signale anhand einer enzymatischen Signalkaskade, bekannt als Phototransduktion, in neuronale Signale um, die sie über die Bipolarzellen zu den retinalen Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht (GCL, *ganglion cell layer*) weiterleiten. Die Kerne der Bipolar-, Horizontal- und Amakrinzellen bilden die innere Körnerzellschicht (INL, *inner nuclear layer*). Die Horizontalzellen mit ihren Synapsen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL, *outer plexiform layer*) und die Amakrinzellen mit ihren Synapsen in der inneren plexiformen Schicht (IPL, *inner plexiform layer*) ermöglichen eine Modulation und Weiterverarbeitung der Signale bereits innerhalb der Retina (Masland 2012). Die Axone der Ganglienzellen bilden die Nervenfaserschicht (NFL, *nerve fiber layer*) und vereinen sich in der Sehnervenpapille zum optischen Nerv. Sie vermitteln die visuelle Information an den visuellen Kortex des ZNS (Trepel 2008, Eysel 2010).

Neben den Neuronen umfasst die Retina auch Mikroglia sowie Makroglia, bestehend aus Müller-Zellen und Astrozyten. Die Makroglia bieten die für die neuronale Aktivität benötigte homöostatische und metabolische Unterstützung der Photorezeptoren und Neurone. Während die Zellkerne der Müller-Zellen in der INL liegen, erstrecken sich ihre Zellfortsätze über alle Retinaschichten und dienen zusätzlich der Stabilität. Astrozyten sind hauptsächlich in der NFL und GCL lokalisiert und wirken bei zahlreichen homöostatischen Funktionen mit (Reichenbach und Bringmann 2019). In der adulten Retina sind die Mikroglia mosaikähnlich über beide plexiforme Schichten, die GCL und die NFL verteilt (Lee et al. 2008, Madeira et al. 2015).

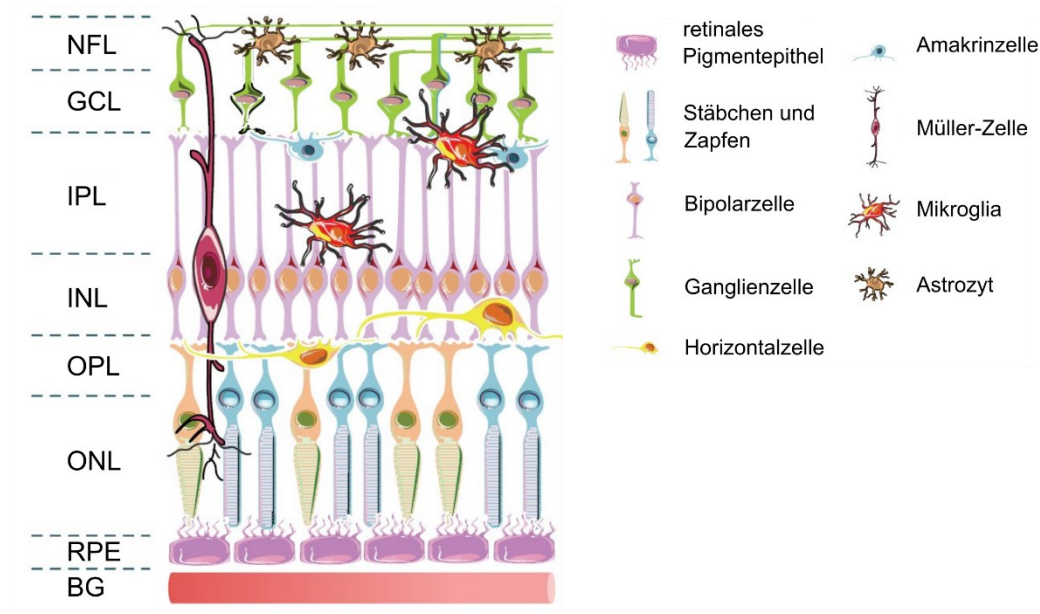


Abbildung 2: Schematische Darstellung der retinalen Schichten anhand ihrer zellulären Komponenten. NFL = Nervenfaserschicht, GCL = Ganglienzellschicht, IPL = innere plexiforme Schicht, INL = innere Körnerzellschicht, OPL = äußere plexiforme Schicht, ONL = äußere Körnerzellschicht, RPE = retinales Pigmentepithel, BG = choroidale Blutgefäße. Modifiziert nach (Madeira et al. 2015).

2.4 Retinale Mikroglia

Ähnlich wie beim ZNS besteht auch bei der Retina eine kontroverse Debatte über den Ursprung der Mikroglia. Da Mikroglia eine regionale Diversität über das gesamte ZNS zeigen (De Biase et al. 2017), ist es wahrscheinlich, dass retinale Mikroglia ontogenetisch den ZNS-Mikroglia ähneln (Silverman und Wong 2018). Amöboide Mikroglia tauchen erstmalig um den Embryonaltag E11.5 im Glaskörper und der vitrealen Seite nahe dem optischen Nerv sowie in den peripheren Anteilen der Retina der Maus auf (Santos et al. 2008). Der genaue Ursprung und die Verteilung innerhalb der Retina sind noch umstritten. Studien zufolge migrieren die Mikroglia auf zwei verschiedenen Wegen in die Retina: von zentral über den optischen Nerv sowie von peripher über die Iris und den Ziliarkörper über den Seitenrand der Retina (Diaz-Araya et al. 1995, Marin-Teva et al. 1998, Marin-Teva et al. 1999b, Santos et al. 2008). Die zentralen Zellen migrieren in horizontaler und tangentialer Ebene von zentral nach peripher und radial von den inneren zu den äußeren Retinaschichten, während die peripheren Zellen es in umgekehrter Richtung tun (Diaz-Araya et al. 1995, Marin-Teva et al. 1999b). Die migrierenden Mikroglia entwickeln eine polarisierte Morphologie und verzweigte Zellfortsätze. Die Zellfortsätze treten in Kontakt mit den Müller-Zellen, die einen Migrationsstimulus darstellen könnten (Sanchez-Lopez et al. 2004). Simultan

zur Migration proliferieren die Mikroglia bis sie ihre ausgereifte Dichte erreichen (Marin-Teva et al. 1999a). Auffällig ist, dass die äußere Retina von der ONL bis zum RPE während der gesamten Entwicklungsphase konsequent frei von Mikroglia bleibt, was diese als mikrogliale Ausschlusszone kennzeichnet (Santos et al. 2008, Silverman und Wong 2018).

In der Retina stellen Mikroglia ähnlich wie im ZNS einen markanten Bestandteil der ortsansässigen (residenten) Gliapopulation dar. Anders als im Hirnparenchym zeigen sie aufgrund der retinalen Struktur eine geschichtete Verteilung. Mit ihrer weitverzweigten Morphologie und dynamischen Zellfortsätzen ähneln sie jedoch denjenigen im ZNS (Lee et al. 2008). Sie besitzen einen schmalen Zellkörper mit langen Zellfortsätzen, die sich über angrenzende Retinaschichten erstrecken können, sich dabei aber nicht überlappen (Lee et al. 2008, Karlstetter et al. 2015). Mikroglia in der oberflächlichen Schicht der NFL sind parallel zu den Nervenfasern gestreckt. In den mittleren Schichten zeigen sie lange und verzweigte Fortsätze und in den tieferen Schichten erscheinen sie etwas kleiner, rundlicher und weniger verzweigt (Diaz-Araya et al. 1995, Provis et al. 1995).

Durch eine extrem hohe Motilität ihrer Zellfortsätze können Mikroglia ihren extrazellulären Bereich innerhalb kürzester Zeit abtasten und decken somit über die Zeit ein größeres territoriales Volumen ab, als zu einem einzelnen Zeitpunkt möglich wäre (Lee et al. 2008). Fontainhas et al. zeigten, dass die Motilität und die Komplexität ihrer Morphologie durch reziproke Neurotransmission beeinflusst wird (Fontainhas et al. 2011). Ähnlich wie im Gehirn interagieren Mikroglia in der Retina mit einer Vielzahl von Zellen. Beispielsweise treten sie in direkten Kontakt mit Photorezeptoren (Singaravelu et al. 2017) oder Müller-Zellen (Wang et al. 2011). Über bidirektionale Interaktionen mit den Müller-Zellen nehmen Mikroglia Einfluss auf die Regulierung der Photorezeptoren (Harada et al. 2002), die Modulierung der retinalen Immunantwort und die Erleichterung der mikroglialen Migration (Wang et al. 2011, Wang et al. 2014). Zudem stehen retinale Mikroglia während der Entwicklung des Auges in engem Kontakt zu den sich entwickelnden retinalen Blutgefäßen und zeigen unterstützende und führende Funktionen (Kur et al. 2012, Silverman und Wong 2018).

Ebenso wie im Gehirn reagieren Mikroglia in der Retina auf eine Verletzung des Gewebes mit einer Änderung ihres Funktionszustandes. Sie bekommen eine zur

Verletzung gerichtete polarisierte Morphologie mit einer Abnahme der Anzahl und Verzweigungen der Zellfortsätze. Einige Mikroglia bekommen eine amöboide Form und migrieren schneller zum Ort der Verletzung als die polarisierten Zellen (Eter et al. 2008, Lee et al. 2008, Paques et al. 2010).

Ähnlich wie im restlichen ZNS zeigen retinale Mikroglia sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Funktionen auf. Einerseits unterstützen Mikroglia den Erhalt der retinalen Integrität unter homöostatischen Bedingungen, andererseits weisen sie auch autodestruktive Reaktionen in der erkrankten Retina auf (Karlstetter et al. 2015).

2.5 Mikrogliale Veränderung im Alter und dystrophe Mikroglia

Angeichts der grundlegenden und vielfältigen Aufgaben der Mikroglia sind diese Zellen für die Funktion des ZNS von zentraler Bedeutung und ihre Dysfunktion ist mit zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert (Hefendehl et al. 2014). Aufgrund ihrer Langlebigkeit, die zum Teil die gesamte Lebensspanne des Individuums beträgt, und der langsamen Proliferationsrate, sind Mikroglia anfällig für Alterungsfaktoren (Ajami et al. 2007). Da das Alter das höchste Risiko für die Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen darstellt, werden alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia durch erhöhte Neurotoxizität und deregulierte Funktionen als Ursache des Fortschreitens pathologischer Prozesse angesehen (Luo et al. 2010, Saijo und Glass 2011, Streit et al. 2014). Während das ZNS altert, scheint die Genauigkeit der regulatorischen Faktoren abzunehmen, da sich die Anzahl, Verteilung und Morphologie der Mikroglia fortschreitend mit der Zeit ändert. Dies spiegelt alterungssensitive Veränderungen in der Mikrogliafunktion wider (Wong 2013).

Während in der grauen Substanz des Neokortex kein Anstieg der Zellzahl gezeigt werden konnte (Sloane et al. 1999, Davies et al. 2017), steigen die Gesamtanzahl und Dichte der Zellen in diversen ZNS-Kompartimenten wie der weißen Substanz (Safaiyan et al. 2016), dem Hippocampus (Mouton et al. 2002), dem visuellen und auditorischen Kortex (Peters et al. 1991, Tremblay et al. 2012) sowie der Retina (Damani et al. 2011) signifikant an. Die Verteilung der Mikroglia im Parenchym wird unregelmäßiger und Veränderungen ihrer funktionellen Dynamik werden deutlich. Im Falle einer Parenchymverletzung fällt die Reaktionsantwort gealterter Mikroglia langsamer und verzögert, dafür aber verlängert aus und die Migrationsgeschwindigkeit nimmt ab (Damani et al. 2011, Hefendehl et al. 2014). Dabei treten keine großen

morphologischen Veränderungen auf (Hefendehl et al. 2014), was vermuten lässt, dass sich diese Zellen bereits in einem Zustand geringer Aktivierung befinden (Conde und Streit 2006). Dem entspricht, dass alte Mikroglia durch eine Hochregulation von MHC II (Ogura et al. 1994, Sheffield und Berman 1998, Frank et al. 2006, Henry et al. 2009, VanGuilder et al. 2011) und TLRs gekennzeichnet sind (Kullberg et al. 2001, Letiembre et al. 2007). Insbesondere im subretinalen Bereich der Retina weisen alte Mikroglia eine erhöhte Expression von Komplementfaktor C3 auf (Ma et al. 2013).

Transkriptom- und Proteomanalysen zeigten, dass inflammatorische Gene im alternden ZNS sowohl von Mäusen als auch von Menschen hochreguliert werden (Lee et al. 2000, Lu et al. 2004, Godbout et al. 2005). In der Retina durchgeführte Transkriptomanalysen zeigten ebenfalls eine Hochregulation von Genen, welche in die Immun- und Stressantwort involviert sind (Yoshida et al. 2002, Chen et al. 2010).

All diese Veränderungen deuten an, dass gealterte Mikroglia durch eine chronische Stimulierung im Alter präkonditioniert werden und überreaktiv (*primed*) auf ein inflammatorisches Geschehen reagieren. Sie können dadurch für das im Alter erhöhte Inflamationsprofil des ZNS mitursächlich sein und neurodegenerative Prozesse verstärken (Sierra et al. 2007, Wong 2013). Zusätzlich kann eine verlängerte Aktivierung zu einer Resistenzbildung von Mikroglia gegen eine Regulierung durch Zytokine und neuronale Signale führen, was in einer Störung der Koordination zwischen dem Immunsystem und dem neuronalen System resultieren kann (Tay et al. 2017a).

Davon abgrenzen lässt sich eine dystrophe Morphologie, die zusätzlich im alternden Gehirn, häufig im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit, gezeigt werden konnte (Streit et al. 2004, Davies et al. 2017, Streit et al. 2020). Bei den dystrophen Zellen sind die Zellfortsätze verkürzt und verdreht (Streit et al. 2004). Sowohl die Zellkörper als auch die Fortsätze weisen häufig multiple, partielle oder komplette Fragmentierungen (*beading*) und lysosomale Einschlusskörperchen auf. Die Zellen können gänzlich mit Zellresten gefüllt sein (Peters et al. 1991, Streit et al. 2004, Tremblay et al. 2012). Diese dystrophe Morphologie könnte alterungsbedingte Veränderungen des Zytoskeletts widerspiegeln (Tischer et al. 2016).

Streit *et al.* zeigten, dass die Zahl dystropher Mikroglia mit steigendem Alter ansteigt, sodass alterungsabhängige Veränderungen zur mikroglialen Degeneration führen

können (Streit et al. 2004, Conde und Streit 2006). Eine mögliche Erklärung ist, dass Mikroglia im Alter seneszent werden (Streit et al. 2004). Replikative oder zelluläre Seneszenz bezeichnet den Zustand des Verlusts der begrenzten Fähigkeit zur Mitose somatischer Zellen (Hayflick 1965). Da Mikroglia mitotische Zellen mit einer limitierten Lebensspanne sind, sind sie anfällig für die replikative Zellseneszenz (Flanary und Streit 2004). Mit jeder Teilung verkürzen sich die Chromosomenenden (Telomere), bis sie eine kritische Länge erreichen und die Zellen seneszent werden. Bei Mikroglia wurden im Alter Telomerverkürzung (Flanary und Streit 2004) und DNA-Schäden, besonders in mikroglialen Mitochondrien, nachgewiesen (Hayashi et al. 2008, von Bernhardt et al. 2015).

Die Phagozytose pathologischer Aggregate kann die dystrophe Morphologie ebenso fördern (Conde und Streit 2006, Spittau 2017). Lopes *et al.* zeigte, dass Mikroglia mit erhöhter L-Ferritin Einlagerung im Alter mit einer dystrophen Morphologie assoziiert sind. Durch Alterung oder Seneszenz verlieren Mikroglia ihre Fähigkeit der Eisenhomöostase und degenerieren (Lopes et al. 2008). Auch konnten dystrophe Mikroglia mit akkumulierten Einschlüssen von hyperphosphorylierten Tau-Aggregaten (Rodriguez-Callejas et al. 2016), Myelin und Lipofuszin (Safaiyan et al. 2016) nachgewiesen werden. Dies legt nahe, dass eine phagozytotische Überladung der Mikroglia zu mangelndem Abbau und damit einhergehender Degeneration führen kann (Neumann et al. 2009).

Neben dem Wachstumsarrest produzieren seneszente Zellen eine Vielzahl an Faktoren, die als *senescence-associated secretory phenotype* (SASP) zusammengefasst werden. Darunter fallen proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Proteasen. Die genaue Zusammensetzung ist abhängig von Zelltyp und Seneszenzursache und kann zur erhöhten Inflammation im Alter beitragen (McHugh und Gil 2018). Sowohl Inflammation als auch ineffektive Proteinbeseitigung sind stark mit Neurodegeneration assoziiert (Angelova und Brown 2019).

Auf Grundlage dieser Veränderungen im Alter wird ein Zusammenhang zwischen Mikroglia und der Abnahme der neuroprotektiven Funktion sowie einer erhöhten Vulnerabilität des ZNS gesehen (Streit et al. 2009, Silverman und Wong 2018). Ein therapeutischer Ansatz besteht darin, die durch Alterung dysfunktionalen Mikroglia gezielt zu entfernen, durch junge Mikroglia zu ersetzen und so eine Selbsterneuerung oder Verjüngung des ZNS zu bewirken (Wong 2013).

2.6 CSF1R-Inhibitor PLX5622 – Mittel zur mikroglialen Depletion *in situ*

Mikroglia sind die einzigen Zellen des Gehirns, die den *colony-stimulating factor 1* (CSF1) Rezeptor exprimieren (Sierra et al. 2007, Erblich et al. 2011). Das Vorhandensein des Rezeptors als auch seiner beiden Liganden CSF1 und IL-34 sind für das Überleben der Mikroglia unabdinglich (Greter et al. 2012, Dagher et al. 2015). Wird dieser Rezeptor in CSF1R-Knockout-Mäusen ausgeschaltet, werden diese Tiere fast vollständig ohne Mikroglia geboren (Ginhoux et al. 2010, Erblich et al. 2011). Dies legt nahe, dass die Signalwege über den CSF1R entscheidend für die Entwicklung und Erhaltung der Mikroglia sind (Dagher et al. 2015). Derartige Knockout-Mäuse werden bereits mit Störungen der Gehirnstruktur geboren und sterben einige Wochen nach der Geburt (Erblich et al. 2011).

Für eine selektive Entfernung der Mikroglia aus dem Gehirn besteht deshalb die Möglichkeit der selektiven pharmakologischen Inhibition des CSF1R durch PLX5622. PLX5622 ist ein oral bioverfügbarer Inhibitor, der nichtinvasiv die Bluthirnschranke überquert und innerhalb weniger Tage zu einer gehirnweiten Entfernung der Mikroglia führt (Elmore et al. 2018, Spangenberg et al. 2019). Es ist ein spezifischeres Schwestermolekül des klinisch genutzten CSF1R-Inhibitors PLX3397, der zusätzlich die Tyrosinkinase c-Kit inhibiert (Tap et al. 2015, Butowski et al. 2016, Spangenberg et al. 2019).

Bei konstanter Gabe des CSF1R-Inhibitors PLX5622 bleibt nur ein Bruchteil der Mikroglia in den Gehirnen und Retinae von Mäusen nachweisbar, während periphere Makrophagen und andere Immunzellen sowie die Gehirnstruktur unverändert bleiben (Dagher et al. 2015, Hilla et al. 2017, Elmore et al. 2018). Ein Vorteil der pharmakologischen Depletion ist, dass die Länge der Depletion durch die Dauer der Inhibitorgabe reguliert werden kann. Nach Absetzen des Inhibitors findet innerhalb weniger Tage eine Repopulation der Mikroglia statt (Elmore et al. 2014, Bruttger et al. 2015, Zhang et al. 2018).

3 Ziele der Arbeit

Die Assoziation von Mikroglia mit neurodegenerativen Erkrankungen im ZNS und der Retina rückt Mikroglia zunehmend in den therapeutischen Fokus. Von Bedeutung ist dabei die Untersuchung alterungsabhängiger Störungen der mikroglialen Homöostase, welche zu einer erhöhten Vulnerabilität für Neurodegenerationen führen kann. Wichtiger Ansatzpunkt ist die gezielte Entfernung altersveränderter Mikroglia und das Ersetzen durch neue Mikroglia, um die physiologische Homöostase wiederherzustellen und den Verlauf neurodegenerativer Erkrankungen positiv zu beeinflussen. Die vorliegende Arbeit fokussierte sich auf die alterungsabhängigen Veränderungen der Mikroglia in der gesunden Mausretina. Des Weiteren wurden die Auswirkungen einer transienten pharmakologischen Depletion und Regeneration der Mikroglia durch den spezifischen CSF1R-Inhibitor PLX5622 untersucht.

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel:

- Untersuchung von Veränderungen retinaler Mikroglia junger und alter Mäuse in Bezug auf ihre Anzahl und Verteilung sowie Morphologie in der gesunden Mausretina.
- Identifizierung heterogener Mikroglia in den Bereichen der Peripherie und der Zentralregion der Retina mithilfe morphologischer Analysen.
- Charakterisierung der Auswirkungen einer transienten pharmakologischen Depletion der Mikroglia durch den CSF1R-Inhibitor PLX5622 in der jungen und alten Retina sowie der mikroglialen Regeneration nach einer solchen Depletion. Dabei war von Interesse, ob die mikrogliale Regeneration einen juvenilen Phänotyp bei den regenerierten Mikroglia hervorruft.
- Untersuchung von Veränderungen in der retinalen Genexpression im Alter sowie nach mikroglialer Depletion und Regeneration.

4 Material

4.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.

Materialien	Hersteller
0,1 ml PCR Strips	Biozym, Deutschland
0,2 ml PCR-Röhrchen (Strip Tubes)	Thermo Fisher Scientific, USA
0,5/1,5/2,0/5,0 ml Reagiergefäße	Sarstedt, Deutschland
15/50 ml CELLSTAR® Tubes Zentrifugenröhrchen	Greiner Bio-One, Österreich
10/200/1000 µl Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Deutschland
10/100/200/1000 µl Pipettenspitzen ohne Filter	Sarstedt, Deutschland
3,5 ml Transferpipetten	Sarstedt, Deutschland
Deckgläser Menzel-Gläser 24 x 50 mm	Thermo Fisher Scientific, USA
Objektträger Menzel-Gläser Superfrost® Plus	Thermo Fisher Scientific, USA
Parafilm	Bemis, USA

Tabelle 2: Laborgeräte.

Geräte	Hersteller
10/100/200/1000 µl Pipette Research Plus	Eppendorf, Deutschland
Corbett RotorGene 6000 qPCR Cycler	Qiagen, Deutschland
Kryostat CM3050 S	Leica Biosystems, Deutschland
LSM 510 META	Zeiss, Deutschland
Magnetrührer RCT basic	IKA Werke, Deutschland
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Deutschland
Pipettierroboter	Corbett Robotics Pty Ltd, USA
QIAxcel Advanced System	Qiagen, Deutschland
Schüttler Titramax 1000	Heidolph, Deutschland
Spektrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, USA
Sprout Mini Centrifuge	Heathrow Scientific, USA
Stemi SV6	Zeiss, Deutschland
Thermocycler T3000	Biometra, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Deutschland
Trockenschrank	Heraeus, Deutschland
Vortexer	Heathrow Scientific, USA
Waage LA 230 S	Sartorius, Deutschland
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, Deutschland

4.2 Chemikalien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller
2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies, USA
4;6-Diamidino-2-Phenylindol Dihydrochlorid	Sigma, USA
<i>Bovine Serum Albumin</i> (BSA, Rinderserumalbumin)	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Chloroform	Sigma, USA
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Deutschland
Ethanol	Merck, Deutschland
Fluoromount-G	SouthernBiotech, USA
Formaldehydlösung, 4 % pH=7,4 (PFA)	SAV Liquid Production, Deutschland
GlycoBlue Coprecipitant	Thermo Fisher Scientific, USA
High purity water	Millipore, USA
Isofluran CP®	CP pharma, Deutschland
iso-Propanol	Sigma, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Deutschland
Kupfer(II)-Sulfat	Sigma-Aldrich, USA
Natriumacetat	Merck, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Germany
Normal Donkey Serum (NDS)	GeneTex, USA
QIAzol Lysis Reagent, 200 ml	Qiagen, Deutschland
Saccharose	Roth, Deutschland
Stickstoff	Linde plc, Irland
Tissue-Tek® O.C.T.™ Compound	Sakura Finetek Europe BV, Niederlande
TritonX-100	Merck, Deutschland

4.3 Tierfutter

Tabelle 4: Tierfutter der Behandlungen.

Tierfutter	Hersteller
Kontrollfutter AIN-76A	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Deutschland
AIN-76A mit Zusatz von 1200 mg/kg des CSF1R Inhibitors PLX5622	Plexxikon Inc., USA
Standardfutter ROD16	Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Deutschland

4.4 Antikörper

Tabelle 5: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie.

Primärantikörper	Firma	Verdünnung
Goat Anti-Iba1	Abcam, England	1:250
Rabbit Anti-Iba1	Wako, USA	1:500
Sekundärantikörper	Firma	Verdünnung
Alexa 488 donkey anti-goat	Thermo Fisher Scientific, USA	1:500
Alexa 488 donkey anti-rabbit	Wako, USA	1:1000

4.5 Lösungen und Puffer

Phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS); 10-fach

Natriumchlorid (137 mM)	80,6 g	(Roth)
Kaliumchlorid (2,7 mM)	2,0 g	(Merck)
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat (10 mM)	17,8 g	(Merck)
Dikaliumhydrogenphosphat (2,0 mM)	2,7 g	(Merck)

in 800 ml destilliertem Wasser auflösen und auf 1000 ml auffüllen.

Phosphatgepufferte Normalsalzlösung (PBS); 1-fach

100 ml 10-fach PBS mit 900 ml destilliertem Wasser verdünnen.

Saccharoselösung; 30%

Saccharose	30 g	(Roth)
PBS	100 ml	

Rinderserumalbumin (BSA); 3%

Rinderserumalbum 3 g (Serva)
 PBS 100 ml

Rinderserumalbumin (BSA); 10%

Rinderserumalbum 10 g (Serva)
 PBS 100 ml

DAPI

4;6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochlorid 5 mg (Sigma)
 Stammlösung 1 mg/ml in 5 ml destilliertem Wasser lösen
 Arbeitslösung 2 µg/ml 1 ml Stammlösung in 500 ml PBS lösen

4.6 Primer-Sequenzen

Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Primer-Sequenzen zur qPCR-Analyse.

Gen	Richtung	Primer Sequenz	Produktgröße
<i>GAPDH</i>	forward	CAACAGCAACTCCCACTCTTC	164
	reverse	GGTCCAGGGTTTCTTACTCCTT	
<i>IL-1β</i>	forward	GAAGAGCCCATCCTCTGTGA	96
	reverse	TTCATCTCGGAGCCTGTAGTG	
<i>IL-6</i>	forward	ACAAAGCCAGAGTCCTTCAGAG	105
	reverse	CATTGGAAATTGGGGTAGGA	
<i>IL-10</i>	forward	ATGGTGTCTTTCAATTGCTCT	98
	reverse	AGGATCTCCCTGGTTTCTCTTC	
<i>TNF-α</i>	forward	GTCTACTGAACTTCGGGGTGAT	102
	reverse	ATGATCTGAGTGTGAGGGTCTG	
<i>CD68</i>	forward	TTCTGCTGTGGAAATGCAAG	116
	reverse	GAGAAACATGGCCCGAAGT	
<i>p16(INK4a)</i>	forward	CTTTGTGTACCGCTGGGAAC	115
	reverse	CTGAGGCCGGATTTAGCTCT	
<i>p21</i>	forward	GACAAGAGGCCCACTACTTC	169
	reverse	TAGAAATCTGTCAGGCTGGT	
<i>p53</i>	forward	AAGACAGGCAGACTTTTCGCC	50
	reverse	CGGGTGGCTCATAAGGTACC	

4.7 Kits

RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)

4.8 Software

Tabelle 7: Softwareangaben.

Software	Hersteller
IBM SPSS Statistics Version 26	IBM, USA
Imaris 9.1	Bitplane, Oxford Instruments, England
Inkscape 0.92.4	Inkscape Community
KNIME Analytics Platform	KNIME, Schweiz
Microsoft-Excel	Microsoft, USA
OriginPro Version 2019b	OriginLab Corporation, USA
ZEN 2009 black edition	Zeiss, Deutschland

5 Methodik

Alle im Folgenden beschriebenen Versuche wurden im Forschungszentrum Lobeda der Friedrich-Schiller-Universität Jena in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Neurologie durchgeführt.

5.1 Experimentelles Design

Als Versuchstiere wurden adulte, männliche Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6Jena genutzt. Dabei handelt es sich um einen Stamm, der unter Bedingungen der hermetischen Inzucht ohne genetische Auffrischung seit mindestens 90 Generationen gehalten wird.

Für die Versuche wurden die Mäuse zwei Altersgruppen zugeordnet. Es wurden junge adulte Mäuse im Alter von 8-14 Wochen (2-3,5 Monate) und alte Mäuse im Alter von 99-108 Wochen (24,5-27 Monate) genutzt. Die jungen adulten Mäuse werden im Folgenden als junge Mäuse bezeichnet.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Standardkäfigen bei einem Tag-/Nachtrhythmus von 14/10 Stunden im Tierstall des Forschungszentrum Lobeda. Wasser und Trockenfutter standen über den gesamten Zeitraum *ad libitum* zur Verfügung. Das verwendete Futter ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Tierhaltung und Tierversuche wurden unter Berücksichtigung des aktuellen Tierversuchsgesetzes der Europäischen Union und des Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV): Gesundheitlicher und technischer Verbraucherschutz (entsprechend gültiger Tierversuchsgenehmigung 02-006-16) durchgeführt. Auf der Abbildung 3 ist die Einteilung und Behandlung der Gruppen dargestellt. Die Aufteilung der Tiere erfolgte in sechs Versuchsgruppen entsprechend des Lebensalters.

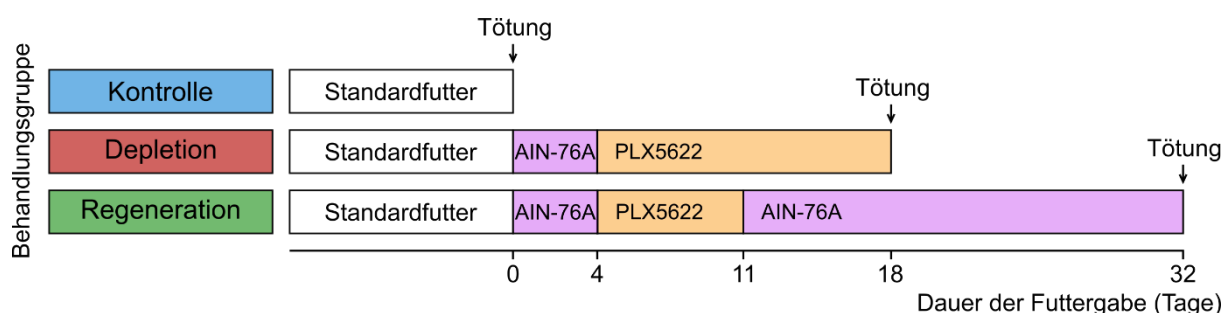


Abbildung 3: Darstellung der Tierbehandlungen und Tötungszeitpunkte. Als Standardfutter diente ROD16.

5.1.1 Kontrollgruppen

Als Kontrolltiere dienten unbehandelte Wildtyp Mäuse des Stammes C57BL/6Jena. Sie wurden wie oben beschrieben in zwei verschiedene Altersgruppen eingeteilt. Die Kontrolltiere bekamen nur das Standardfutter des Tierstalls.

5.1.2 Depletionsgruppen - PLX5622 behandelte Tiere

Ziel des Versuchs mit dieser Gruppe war es, den alterungsabhängigen Effekt des CSF1R-Inhibitors PLX5622 auf die Mikroglia in der jungen und alten Retina zu untersuchen sowie die nicht depletierten Mikroglia zu charakterisieren.

Die Tiere dieser Gruppe erhielten Futter mit einer Konzentration von 1200 mg/kg des CSF1R-Inhibitors PLX5622. Die Tiere wurden über vier Tage mit dem Kontrollfutter AIN-76A und anschließend mit dem PLX5622-angereicherten Futter gefüttert. Die Fütterung mit dem PLX5622-angereicherten Futter erfolgte über einen Zeitraum von 14 Tagen *ad libitum*. Am 18. Tag wurden die Tiere getötet und die Augen für weitere Analysen entnommen. Die Tiere wurden wie oben beschrieben in zwei verschiedene Altersgruppen geteilt.

5.1.3 Regenerationsgruppen

Die Tiere dieser Gruppe erhielten analog der bereits beschriebenen Depletionsgruppe das Kontrollfutter AIN-76A über vier Tage und wurden anschließend mit 1200 mg/kg des CSF1R-Inhibitors PLX5622 angereicherten Futter behandelt. Die Fütterung des PLX5622-angereicherten Futters erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen *ad libitum*. Am 11. Tag wurde das PLX5622-angereicherte Futter abgesetzt und die Tiere bekamen für weitere drei Wochen das Kontrollfutter. Am 32. Tag erfolgte die Tötung der Tiere und die Augen wurden für die Analysen entnommen. Die Tiere wurden wie oben beschrieben in zwei verschiedene Altersgruppen geteilt.

5.2 Gewebegewinnung

Die Tiere wurden durch eine Überdosis Isofluran CP® getötet. Die Feststellung des Todes erfolgte durch Ausbleiben von Atmung, Herzschlag und Dreh- beziehungsweise Zwischenzehenreflex. Für die RNA-Analyse wurden die Tiere für fünf Minuten mit kaltem PBS transkardial perfundiert und die Bulbi oculi aus den Orbitae entnommen. Die Retinae wurden unter einem Mikroskop mithilfe mikrochirurgischer Pinzetten und

Scheren präpariert. Durch einen Schnitt entlang des *Limbus corneae* wurde die Cornea abgetrennt. Ziliarkörper, Linse und Glaskörper wurden vorsichtig entfernt. Für die immunhistochemische Verwendung verblieb die Retina im Augenbecher. Für die Verwendung in der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) wurde die Retina vorsichtig mobilisiert und von der Sklera und Choroidea separiert. Die isolierten Retinae wurden in ein 2 ml Reagiergefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80 °C.

Für die Immunhistochemie wurden die Tiere für zwei Minuten mit kaltem PBS und anschließend für acht Minuten mit eiskaltem vierprozentigem Paraformaldehyd (PFA) zur Erstfixierung transkardial perfundiert. Die Bulbi oculi wurden aus den Orbitae entnommen und wie oben beschrieben präpariert. Es erfolgte eine halbstündige Nachfixierung in eiskaltem vierprozentigem PFA. Die fixierten Augenbecher wurden mindestens einen Tag in 30 %-iger Saccharose dehydriert, bis diese vollständig in der Lösung abgesunken sind. Daraufhin wurden die Augäpfel in Tissue-Tek® O.C.T. Compound in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C aufbewahrt. Das Schneiden der Retinaschnitte erfolgte am Kryostat. Die Dicke der Schnitte betrug 16 µm. Die Schnitte wurden der Reihe nach auf insgesamt 16 Objektträgern so verteilt, dass jeder Objektträger die gesamte Retina widerspiegelt (s. Abbildung 4).

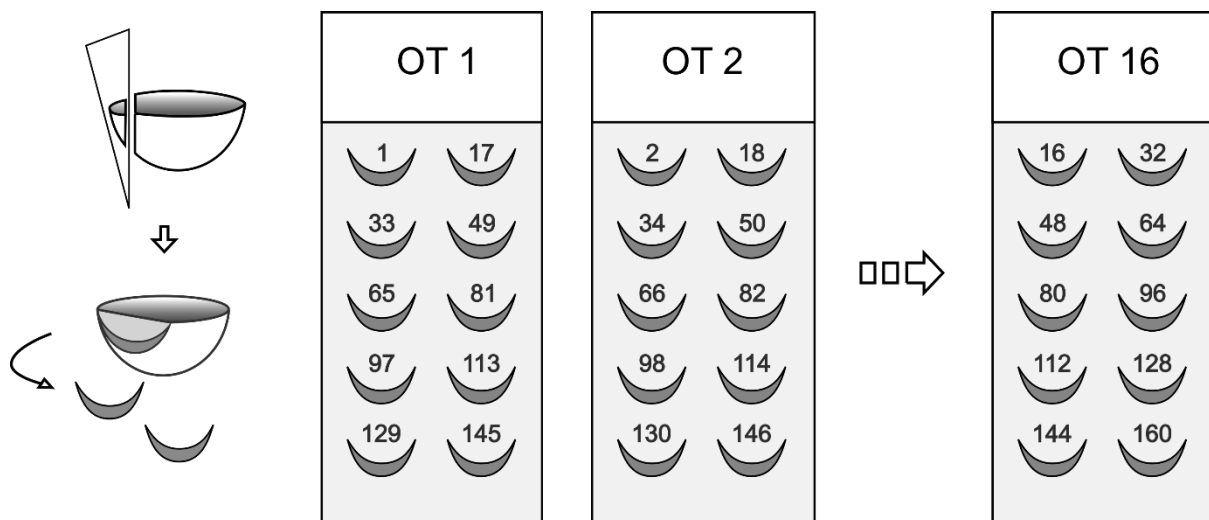


Abbildung 4: Darstellung der Schnittführung durch die Retina und die Verteilung der Schnitte auf den Objektträgern (OT). Modifiziert nach (Wohl et al. 2011).

5.3 Immunhistochemische Färbung

Mithilfe immunhistochemischer Färbungen erfolgte eine Evaluierung morphologischer Veränderungen in jungen und alten Mausretinae nach vorübergehender und selektiver Depletion der Mikroglia durch den CSF1R-Inhibitor PLX5622 sowie der mikroglialen Regeneration nach Absetzen des Inhibitors.

Die Objektträger wurden für 45 Minuten bei 37 °C getrocknet. Im Anschluss folgte eine 20-minütige Fixierung der Schnitte in vierprozentigem PFA. Mögliche Reste von PFA wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden die Objektträger für zwei Stunden bei Raumtemperatur in Blockierungslösung (1x PBS + 10 % BSA + 10 % NDS + 0,3 % Triton X-100) inkubiert. Als Normalserum wurde normales Eselserum (NDS, *normal donkey serum*) verwendet. Im Anschluss erfolgte die lichtgeschützte Inkubation mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4 °C. Diese wurden zuvor in einer Primärantikörperlösung (1x PBS + 5 % BSA + 5 % NDS + 0,3% Triton X-100) gelöst. Die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 5 aufgeführt. Am folgenden Tag wurden ungebundene Primärantikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur mit einem Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper Alexa Fluor 488 nm. Dieser wurde zuvor in einer Sekundärantikörperlösung (1x PBS + 3 % BSA + 10 % NDS + 0,3 % Triton X-100) verdünnt. Um überschüssige Antikörper zu entfernen, wurden die Objektträger anschließend dreimalig mit PBS gewaschen. Es folgte eine fünfminütige Inkubation mit DAPI zur Färbung der Zellkerne.

Nach weiteren drei Waschschritten mit PBS wurden die Objektträger unter der Verwendung von Fluoromount G mit Deckplättchen eingedeckelt und über Nacht trocknen gelassen. Um die Spezifität der Sekundärantikörper zu bestimmen, erfolgte bei jeder Färbung die Durchführung von Negativkontrollen.

Die Aufnahme der Retinaschnitte erfolgte am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta mit einem *EC Plan-Neofluar 40X/1.30 Oil DIC M27* Öl-Objektiv (Zeiss). Jeder Retinaschnitt wurde in drei Bereiche geteilt: beide Peripherien und die Zentralregion (vgl. Abbildung 5). Für die statistische Auswertung wurden die Aufnahmen beider Peripherien im Anschluss zusammengefasst. Pro Bereich wurde jeweils eine 3D-Aufnahme (1024 x 1024 Pixel) mittels eines *z-stack* (1 µm Intervalle, 13-23 µm Dicke) aufgenommen. Falls innerhalb dieses Bereiches keine Zelle vorhanden war, entfiel die Aufnahme.

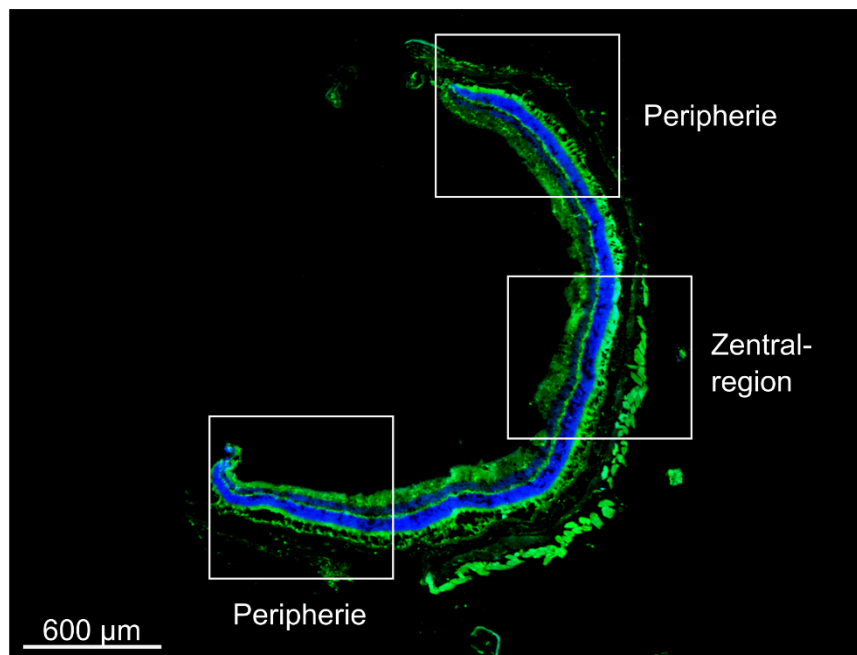


Abbildung 5: Übersichtsaufnahme der Retina. Einteilung der Aufnahmebereiche in Zentralregion und Peripherie.

Die Anzahl der Mikroglia wurde durch Zählen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta erfasst. Pro Untersuchungsgruppe wurden vier Retinae von vier verschiedenen Mäusen in jeweils vier verschiedenen Querschnitten gezählt. Dafür wurden die Objektträger 1, 6, 11 und 16 ausgewählt, um die Retina möglichst allumfassend abzubilden. Die Zellen wurden in den folgenden Retinaschichten gezählt: IPL zusammengefasst mit der GCL (IPL + GCL), INL, OPL und ONL. Im Anschluss wurde die erfasste Zellzahl auf die Gesamtretna hochgerechnet. Ermittelt wurde die Zellzahl pro Schicht sowie die Gesamtzellzahl pro Retina.

Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS *Statistics* Version 26. Jede Behandlungsgruppe bestand aus vier Versuchstieren ($n = 4$). Insgesamt wurden 24 Retinae untersucht. Aufgrund der geringen Stichprobengröße wurden die Behandlungsgruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test verglichen, gefolgt von einem Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,05$. Pro Schicht wurde der Median der Anzahl an Zellen sowie der Interquartilsabstand berechnet.

5.4 Morphologische Analyse der retinalen Mikroglia

Die semiautomatische Bildanalyse erfolgte mithilfe der Software Imaris 9.1. Es wurden nur Mikroglia untersucht, deren Fortsätze vollständig innerhalb der 3D-z-stack Aufnahmen lagen. In der Abbildung 6B sind die morphologischen Parameter vereinfacht dargestellt. Folgende Parameter wurden untersucht:

- *Filament length (sum)*: Die Gesamtlänge wird aus der Summe der Längen aller Fortsatzsegmente einer Zelle berechnet.
- *Filament Full Branch Depth*: Der maximale Verzweigungsgrad einer Zelle.
- *Filament Full Branch Level*: Die maximale Ordnung der Zellfortsätze einer Zelle.
- *Filament No. Dendrite Segments*: Die Anzahl der Fortsatzsegmente einer Zelle.
- *Filament No. Dendrite Terminal Points*: Die Anzahl der Fortsatzendpunkte einer Zelle.
- *Filament No. Sholl intersections*: Die Sholl-Analyse gibt Informationen über die Anzahl und Anordnung der Verzweigungen in einer bestimmten Distanz vom Zellkörper (Catalin et al. 2013). Dabei wird vom Zellkern ausgehend eine Reihe konzentrischer Kugeln in steigendem Radius von 1 μm erzeugt. Erfasst werden alle Schnittpunkte der Zellfortsätze mit diesen Kugeln (vgl. Abbildung 6A). Für die statistische Auswertung wurde die Anzahl der Schnittpunkte pro Radius graphisch dargestellt und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Fläche unter der Kurve stellt die Gesamtsumme der Schnittpunkte einer Zelle mit den Sholl-Radien dar.

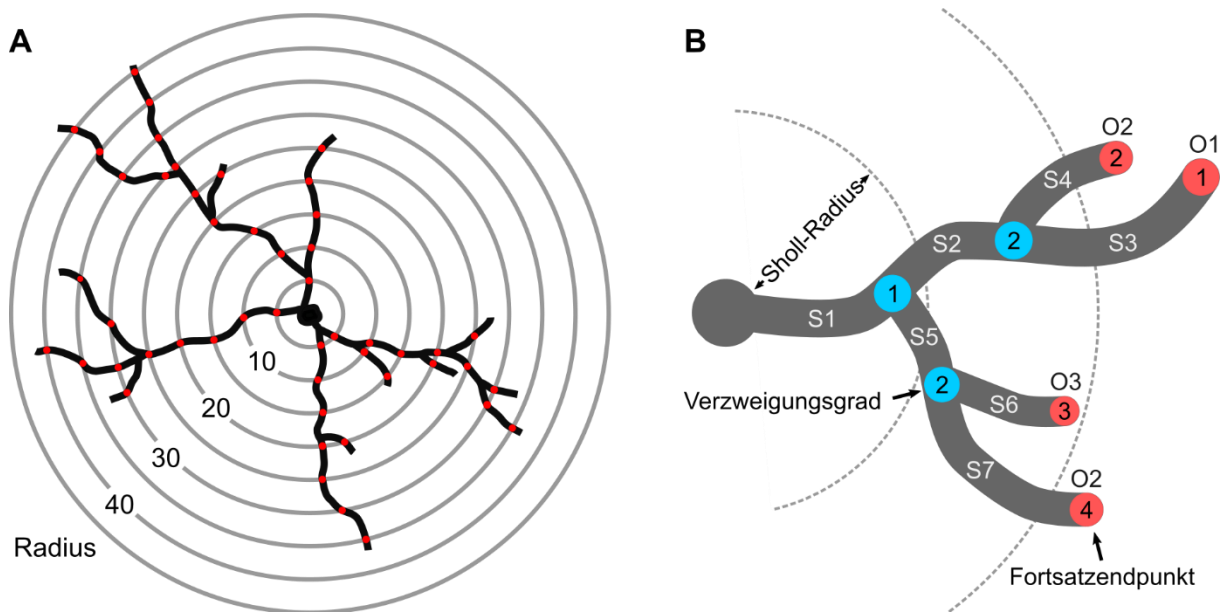


Abbildung 6: Schematische Darstellung einiger morphologischer Parameter. **A** Beispielhafte 2D-Darstellung der Sholl-Analyse. Konzentrische Kugeln werden beginnend vom Zellkern der rekonstruierten Mikroglia in gleichen Abständen angeordnet. In diesem Beispiel steigt der Radius mit jeder Kugel um $5\ \mu\text{m}$. Die Schnittpunkte der Zellfortsätze mit den Kugeln sind farblich hervorgehoben. **B** Vereinfachte Darstellung weiterer morphologischer Parameter. Dargestellt wird der Verzweigungsgrad (blau), die Ordnung der Fortsätze (O), die Anzahl der Fortsatzsegmente (S) und die Anzahl der Fortsatzendpunkte (rot). Da die Parameter sich auf die Gesamtzelle beziehen, stellt die Abbildung auch die maximalen Werte des Verzweigungsgrads und der Ordnung der Fortsätze pro Zelle dar. Im Beispiel beträgt der maximale Verzweigungsgrad: 2, die maximale Ordnung der Fortsätze: 3 (O3), die Anzahl der Segmente: 7 (S7), die Anzahl der Fortsatzendpunkte: 4.

- *Filament Convex Hull Fläche und Volumen:* Die Fläche und das Volumen der Zelle wurden durch die Erzeugung eines minimalen konvexen Polyeders berechnet, welcher durch die Endpunkte der Zellfortsätze definiert ist (vgl. Abbildung 7). Die Daten ergeben sich aus den statistischen Werten dieser neu erzeugten Oberfläche. Diese Art der konvexen Rumpfmessung ermöglicht eine Messung der Zellfortsatzausbreitung, bei der die räumliche Komponente der Zelle erhalten bleibt und der territoriale Raum einer einzelnen Mikroglia bestimmt wird.

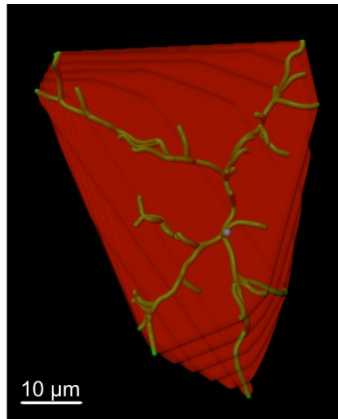


Abbildung 7: Darstellung der Volumenbestimmung durch die Filament Convex Hull Funktion.

Die von der Software Imaris 9.1 erstellten Datentabellen wurden mithilfe von KNIME *Analytics Platform* sowie Microsoft-Excel zusammengeführt. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS *Statistics* Version 26.

Jede Behandlungsgruppe bestand aus vier Versuchstieren ($n = 4$). Aufgrund der natürlichen Variabilität wurde eine unterschiedliche Anzahl an Zellen pro Tier erfasst. Um möglichst keine Verzerrungen der unterschiedlichen Fallzahlen zu generieren, wurde diese hierarchische Struktur durch ein gemischtes lineares Modell zum Vergleich der Behandlungsgruppen angepasst. Es erfolgte ein Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,05$. Angegeben werden die aus dem Modell geschätzten Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle sowie die korrigierten p -Werte.

5.5 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung aus den eingefrorenen Retinae erfolgte durch die QIAzol-Extraktion und der anschließenden *iso*-Propanolfällung. Durch Zugabe von 200 μ l QIAzol Lysis Reagent zur gefrorenen Retina und anschließendem Dispergieren mit einem Homogenisator erfolgten Lyse und Homogenisierung des Gewebes. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Gemisch 40 μ l Chloroform zugegeben. Nach kurzem Vortexen erfolgte eine dreiminütige Inkubation bei Raumtemperatur. Eine 20-minütige Zentrifugation mit einer Beschleunigung von 12.000 g bei 4 °C erreichte eine Separation des Reaktionsgemisches in drei Phasen: eine wässrige RNA-haltige Oberphase, eine DNA-haltige Interphase und eine proteinhaltige organische Unterphase. Die RNA-haltige Oberphase wurde vorsichtig

abpipettiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Im Anschluss folgte die *iso*-Propanolfällung.

Dazu wurde jeweils 1,1 Volumen Oberphase an *iso*-Propanol und 0,16 Volumen Oberphase an Natriumacetat (2 M, pH = 4,0) zugesetzt. Zur besseren Visualisierung der Fällung wurde dem Natriumacetat zuvor 2 µl GlycoBlue hinzugefügt. Durch kurzes manuelles Schütteln wurden die Substanzen vermischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zentrifugenröhrchen für 15 Minuten mit einer Beschleunigung von 12.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes erfolgten zwei Waschschrte mit jeweils 200 µl Ethanol, um Phenolreste und andere Kontaminanten zu entfernen. Die Zentrifugenröhrchen wurden im Anschluss mit einer Beschleunigung von 7.600 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Eine anschließende Trocknung bei 65 °C im Heizblock diente der Eliminierung verbliebener Ethanolreste. In einem letzten Schritt folgte die Elution der RNA in 12,5 µl RNA-freiem Wasser bei 65 °C für fünf Minuten im Heizblock. Die Bestimmung der RNA-Menge, -Qualität und -Integrität erfolgte durch spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung am NanoDrop 2000c und der dazugehörigen Software. Hierzu erfolgte die Messung der UV-Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) aus 1 µl der jeweiligen unverdünnten Probe. Die RNA-Menge der Proben wurde anschließend in Abhängigkeit von der jeweiligen Ausgangskonzentration durch Zugabe von RNase-freiem Wasser auf 100 µg/µl standardisiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde das Eluat im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

5.6 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese wurde unter Verwendung des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* durchgeführt. Es wurden 100 ng RNA pro Synthese verwendet und auf 5 ng/µl verdünnt. Zum Degradationsschutz wurden die RNA-Proben auf Eis gelagert. Der Präinkubationsansatz (0,6 µl Oligo (dT)₁₈ Primer, 0,5 µl Random Hexamer Primer) wurde angesetzt. Zu jeweils 5 µl RNA (100 ng/µl) wurden 1,1 µl Präinkubationsansatz pipettiert. Es folgte eine fünfminütige Inkubation bei 65 °C im Thermocycler mit anschließendem Abkühlen auf 4 °C. Anschließend folgte die Reverse Transkription. Der Reaktionsansatz (2 µl 5X Reaction Buffer, 1 µl dNTP (10 mM), 0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor (20 u/µl), 0,5 µl Revert Aid Reverse Transcriptase (200 u/µl)) wurde

zum Präinkubationsgemisch gegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte im Thermocycler entsprechend folgendem Protokoll:

Inkubation für fünf Minuten bei 25 °C, Transkription für 60 Minuten bei 42 °C, Stoppen der Reaktion durch Erhitzen auf 70 °C für fünf Minuten und abschließendes Abkühlen der Proben auf 4 °C. Die cDNA-Proben wurden in einem Verhältnis von 1:10 auf 5 ng/μl verdünnt. Für die Erstellung einer Wasserkontrolle wurde dasselbe Protokoll genutzt, allerdings statt der Reaktionsansätze die entsprechende Menge RNase-freiem Wasser pipettiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20 °C gelagert.

Zur Qualitätskontrolle wurde für alle Proben der jeweilige *RNA-Integrity Score* (RIS)-Wert mittels *Qiaxcel Advanced System* bestimmt (Abbildung 8). Alle Proben wiesen einen RIS-Wert $\geq 6,7$ auf. Proben, die keine Banden aufwiesen, wurden aus der statistischen Wertung ausgeschlossen.

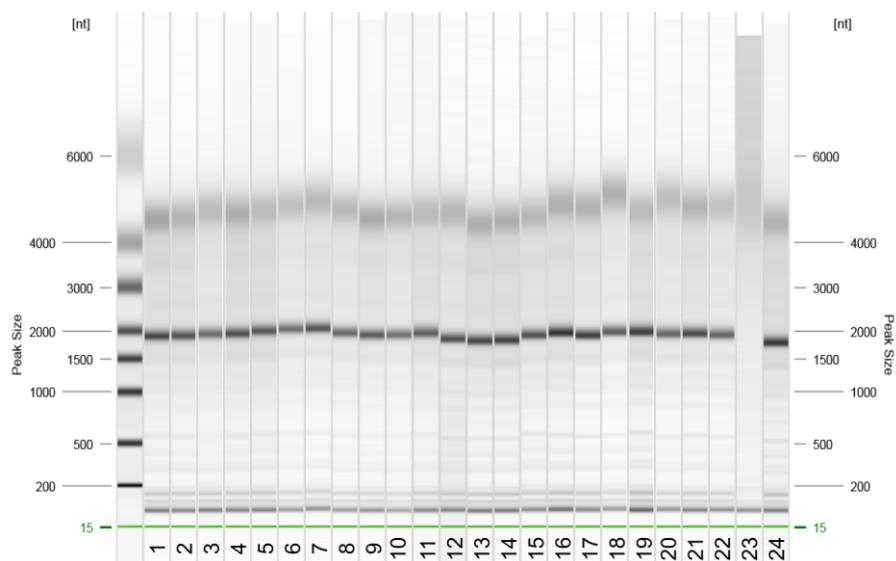


Abbildung 8: RNA-Integrity Score (RIS) Gel der genutzten Proben.

5.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die qPCR wurde mit einem SYBR Green Kit und einem Corbett RotorGene 6000 durchgeführt. Durch die qPCR wurden die Expressionslevel folgender Marker untersucht: Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 10 (IL-10), CD68 sowie die Tumorsuppressorgene p16^{Ink4a} (p16), p21 und p53. Das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

diente als Referenzgen. Die eingesetzten Primersequenzen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Zum Degradationsschutz wurden die cDNA-Proben vorsichtig auf Eis aufgetaut. Die Primermixe wurden in einer Endkonzentration von 2 μM angesetzt (10 μl Forward-Sequenz (100 μM), 10 μl Reverse-Sequenz (100 μM), 480 μl RNase-freies Wasser). Zu jedem Reaktionsansatz (10 μl 2x Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix, 5 μl Primermix (2 μM)) wurden 5 μl cDNA pipettiert. Die qPCR erfolgte im Corbett RotorGene 6000. Nach einem Denaturierungsschritt für drei Minuten bei 95 °C wurden 40 Amplifizierungszyklen wie folgt durchgeführt: Denaturierung bei 95 °C für zehn Sekunden, Primerhybridisierung bei 60 °C für 15 Sekunden und Elongation bei 72 °C. Für die Schmelzkurve folgte eine schrittweise Temperaturerhöhung um jeweils 0,5 °C bis zur Endtemperatur von 95 °C.

Zur Ermittlung der relativen Expressionsrate der Zielgene erfolgte die von Pfaffl *et al.* eingeführte Analyse (Pfaffl 2001, Pfaffl 2004). Die junge Kontrollgruppe diente als Bezugsgruppe. Die statistische Auswertung erfolgte mit IBM SPSS *Statistics* Version 26. Jede Gruppe bestand aus drei bis vier Versuchstieren ($n = 3-4$). Aufgrund der geringen Stichprobenanzahl wurde der Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der relativen Expressionsraten zwischen den Behandlungsgruppen durchgeführt. Es folgte ein Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau betrug $\alpha = 0,05$. Alle Ergebnisse sind als Median mit Interquartilsabstand angegeben. Waren in einer Behandlungsgruppe nur zwei oder drei Werte vorhanden, wurden Minimum und Maximum statt des Interquartilsabstands angegeben.

6 Ergebnisse

6.1 Anzahl und Verteilung der Mikroglia in den Retinae junger und alter Mäuse

In den Retinaschichten GCL, IPL, INL, OPL und ONL wurden Iba1-positive Mikroglia durch Fluoreszenzmikroskopie in unbehandelten und behandelten Mäusen analysiert (Abbildung 9). Insgesamt wurden 24 Retinae untersucht.

Alle Werte beziehen sich auf die Anzahl an Zellen und sind mit folgendem Muster als Median mit Interquartilsabstand (Median (Interquartilsabstand)) angegeben und in Abbildung 10 dargestellt. Die Prozentangaben wurden anhand der Mediane errechnet.

Die Mikroglia waren vornehmlich in den inneren Schichten der Retina lokalisiert und zeigten eine horizontale laminare Verteilung, die sich von der GCL bis zur OPL erstreckte. Nur einige wenige Zellen waren gelegentlich in der ONL oder in den subretinalen Schichten vertreten. Die Mikroglia zeigten eine regelmäßige Anordnung in den Schichten mit überwiegend weitverzweigten Zellfortsätzen. Diese dehnten sich auch in andere Schichten aus, ohne dass es zu gegenseitiger Überlappung kam (s. Abbildung 9).

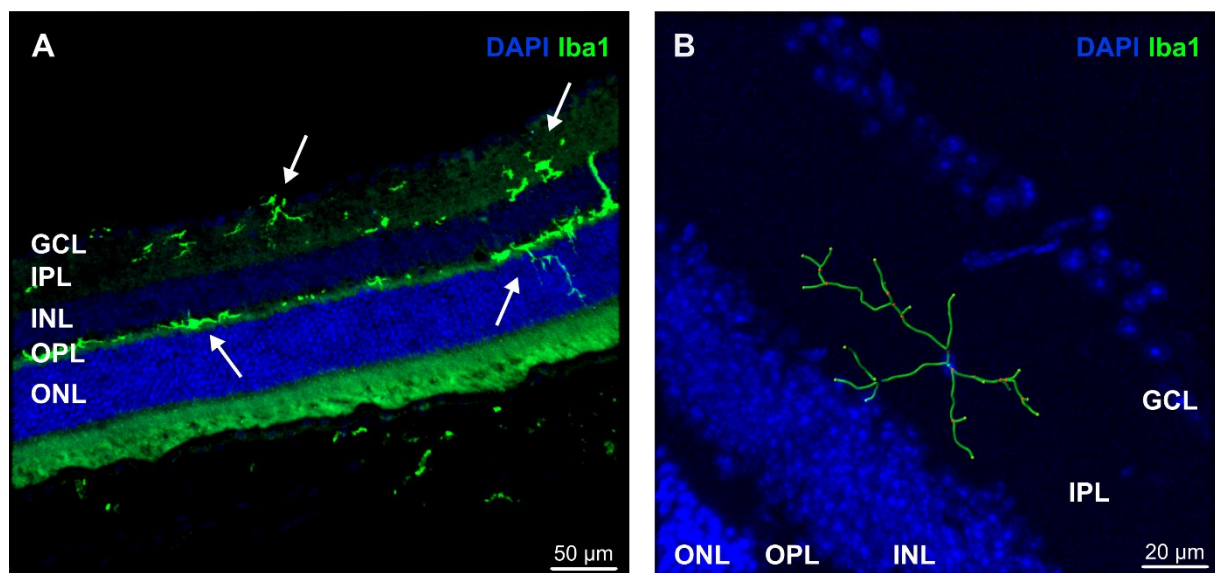


Abbildung 9: Verteilung und Morphologie von Mikroglia innerhalb der retinalen Schichten. **A** Querschnitt einer adulten Mausretina. Iba1-markierte Mikroglia (Pfeile) sind in der inneren plexiformen Schicht (IPL) und der äußeren Plexiformen Schicht (OPL) verteilt. Zellfortsätze reichen teilweise in andere Schichten. **B** rekonstruierte Mikroglia mit weitverzweigten Zellfortsätzen in der IPL. GCL = Ganglienzellschicht, INL = innere Körnerzellschicht, ONL = äußere Körnerzellschicht. Doppelfärbung mit DAPI und Iba1.

6.1.1 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia

Der größte Anteil der Mikroglia befand sich sowohl in der jungen als auch in der alten Kontrollgruppe in der IPL + GCL, dicht gefolgt von der OPL. In der jungen Kontrollgruppe umfasste die IPL + GCL 56 % der Mikroglia (2.706 (1.365)) während sie in der alten Kontrollgruppe 50 % der Mikroglia (3.420 (797)) umfasste (vgl. Abbildung 10A). In der INL befanden sich geringfügig weniger Mikroglia bei der jungen (112 (125), 2 %) als bei der alten Kontrollgruppe (257 (63), 4 %) (s. Abbildung 10B). Auch in der OPL befanden sich geringfügig weniger Mikroglia bei der jungen (2.016 (1.824), 42 %) als bei der alten Kontrollgruppe (3.104 (1.630), 46 %) (s. Abbildung 10C). Während in der ONL bei der jungen Kontrollgruppe keine Mikroglia nachweisbar waren, konnten bei der alten Kontrollgruppe einige Mikroglia detektiert werden (40 (37), 1 %) (s. Abbildung 10D). Die Kontrollgruppen zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede ($p = 1,0$).

6.1.2 Wirkung von PLX5622 auf die Anzahl der Mikroglia

Es erfolgte eine Zählung der nicht depletierten Mikroglia in den Retinae. Die junge Kontrollgruppe wies 4.844 (3.126) Iba1-positive Zellen, die alte Kontrollgruppe wies 6.880 (2.207) Iba1-positive Zellen pro Retina auf. Nach zweiwöchiger Behandlung mit PLX5622 waren nur noch 16 % (776 (863)) in jungen sowie 16 % (1.087 (676)) in alten Mäusen detektierbar (vgl. Abbildung 10E). Die Behandlung entfernte in beiden Altersgruppen 84 % der Mikroglia. Die Verteilung der Mikroglia über die verschiedenen Retinaschichten ähnelte der Verteilung in den Kontrollgruppen. Der größte Anteil der Mikroglia befand sich auch hier sowohl in der jungen (408 (444), 57 %) als auch in der alten Depletionsgruppe (750 (602), 65 %) in der IPL + GCL (s. Abbildung 10 A). In der INL befanden sich bei der jungen 8 % (56 (70)), bei der alten Depletionsgruppe 7 % (84 (17)) der Mikroglia (s. Abbildung 10B). In der OPL befanden sich bei der jungen Depletionsgruppe (258 (525), 36 %) prozentual mehr Zellen als bei der alten Depletionsgruppe (314 (223), 27 %) (s. Abbildung 10C). Während in der ONL bei der jungen Depletionsgruppe keine Zellen nachweisbar waren, konnten bei der alten Depletionsgruppe vereinzelt Zellen detektiert werden (0 (27), 0 %) (s. Abbildung 10D). Die Gruppen zeigten keine statistisch relevanten Unterschiede ($p = 1,0$).

6.1.3 Beurteilung der mikroglialen Regeneration

Das Absetzen von PLX5622 stimulierte die Repopulation der Retina mit neuen Mikroglia. Nach 21 Tagen wies sowohl die junge (6.748 Zellen (2.264)) als auch die alte Regenerationsgruppe (8.265 Zellen (2.515)) eine erhöhte Anzahl an Mikroglia im Vergleich zu den Kontrollgruppen auf (vgl. Abbildung 10E). Die junge Regenerationsgruppe zeigte einen 39 %-igen, die alte Regenerationsgruppe einen 20 %-igen Anstieg der Mikrogliaanzahl in der Retina im Vergleich zur jungen beziehungsweise zur alten Kontrollgruppe. Auch hier zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Mikroglia über die verschiedenen Retinaschichten wie in den Kontrollgruppen. Der größte Anteil der Mikroglia befand sich sowohl bei der jungen (3.606 Zellen (803), 54 %) als auch der alten Regenerationsgruppe (4.431 (1.477), 55 %) in der IPL + GCL (s. Abbildung 10A). In der INL wies die junge Regenerationsgruppe große Zellzahlschwankungen auf (140 (1.327), 2 %), während die alte Regenerationsgruppe nur geringe Zellzahlen in dieser Retinaschicht aufzeigte (136 (132), 2 %) (s. Abbildung 10B). In der OPL konnte in der jungen (2.960 (630)) wie in der alten Regenerationsgruppe (3.551 (1461)) 44 % der Mikroglia detektiert werden (s. Abbildung 10C). In der ONL konnten sowohl in der jungen (0 (60), 0 %) als auch der alten Regenerationsgruppe (0 (35), 0 %) nur vereinzelt Mikroglia nachgewiesen werden (s. Abbildung 10D).

Zwischen den beiden Regenerationsgruppen sowie im Vergleich zu den Kontrollgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Wie in der Abbildung 10A verdeutlicht, zeigte sich aber ein signifikanter Unterschied in der IPL + GCL zwischen der jungen Regenerationsgruppe zur jungen Depletionsgruppe (3.606 (803) vs. 408 (444); $p = 0,048$) sowie zwischen der alten Regenerationsgruppe und der alten Depletionsgruppe (4.431 (1.477) vs. 750 (602), $p = 0,034$).

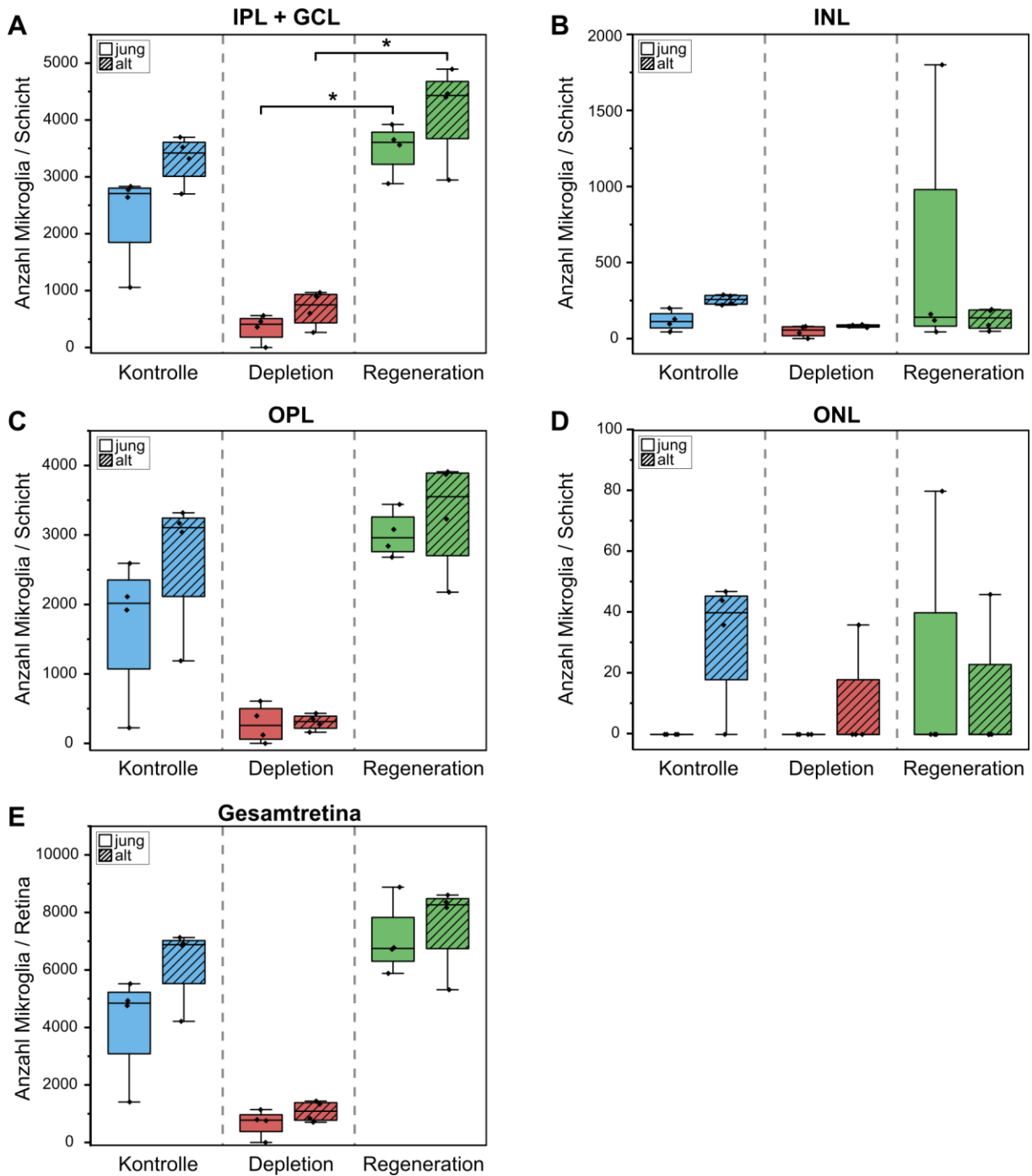


Abbildung 10: Anzahl und Verteilung der Mikroglia. Betrachtet wurden die einzelnen Schichten der Retina (A-D) sowie die gesamte Retina (E). Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

6.2 Morphologische Analyse der jungen und alten retinalen Mikroglia

Da die Mikroglia in der Peripherie und Zentralregion der Retina einen unterschiedlichen Ursprung haben können, wurden diese in den beiden Regionen getrennt untersucht. Aufgrund der zweifachen Aufnahmen in der Peripherie gingen fast doppelt so viele Zellen in die Betrachtung der Peripherie ein als in die der Zentralregion. Für die morphologische Analyse wurden die Gesamtlänge der Zellen, ihre territoriale Fläche und das aufgespannte Volumen erfasst. Ferner wurden weitere Parameter zur Erfassung der Komplexität der Zellen bestimmt: der maximale Verzweigungsgrad, die maximale Ordnung der Fortsätze, die Anzahl der Fortsatzsegmente und die Anzahl der Fortsatzendpunkte pro Zelle. Des Weiteren erfolgte eine Analyse der Sholl-Kurven (vgl. Abbildung 6).

Angegeben werden im Folgenden die aus dem Modell geschätzten Mittelwerte, die 95 %-Konfidenzintervalle (im Folgenden angegeben als Mittelwert [95 %-Konfidenzintervall]) sowie die korrigierten *p*-Werte.

6.2.1 Allgemeiner Vergleich der Regionen

Die Untersuchungen hatten zum Ziel, die Mikroglia mit Hilfe morphologischer Parameter und ihrer Lage in der Retina zu unterscheiden. Wie in der Abbildung 5 dargestellt, wurden als Regionen die Zentralregion und die Peripherie der Retina ausgewählt. Es gingen nur vollständig detektierbare Zellen in die Betrachtung ein, sodass die Analyse eine unterschiedliche Anzahl an Zellen pro Retina auffasste: Zentralregion (*n* = 237), Peripherie (*n* = 407).

Für die statistische Auswertung wurde der gesamte Datensatz verwendet und die Region als Faktor gesetzt, sodass ein Regionsvergleich über alle Behandlungsgruppen hinweg erfolgte.

In der Zentralregion wiesen Mikroglia eine Länge von 195,1 µm [178,5-211,7 µm], in der Peripherie eine Länge von 177,8 µm [162,6-193,1 µm] auf. Mikroglia in der Zentralregion waren somit über alle Gruppen hinweg 17,3 µm [3,6-30,9 µm] länger als in der Peripherie (*p* = 0,013). Auch in der Fläche und dem Volumen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Zentralregion und der Peripherie. Während Mikroglia in der Zentralregion eine Fläche von 2.914,6 µm² [2.593,7-3.235,6 µm²]

einnahmen, nahmen Mikroglia in der Peripherie eine Fläche von $2.584,6 \mu\text{m}^2$ [$2.285,7$ - $2.883,5 \mu\text{m}^2$] ein. Die Mikroglia in der Zentralregion besaßen somit eine um $330,1 \mu\text{m}^2$ [$89,7$ - $570,4 \mu\text{m}^2$] größere territoriale Fläche als in der Peripherie ($p = 0,007$). Die Mikroglia in der Zentralregion umfassten ein Volumen von $6.462,9 \mu\text{m}^3$ [$5.389,3$ - $7.536,6 \mu\text{m}^3$], die Mikroglia in der Peripherie dagegen nur ein Volumen von $5.666,7 \mu\text{m}^3$ [$4.658,7$ - $6.674,8 \mu\text{m}^3$]. Die Mikroglia der Zentralregion nahmen ein um $796,2 \mu\text{m}^3$ [$33,5$ - $1.558,9 \mu\text{m}^3$] größeres Volumen ein als in der Peripherie ($p = 0,041$). Beim maximalen Verzweigungsgrad pro Zelle zeigten beide Regionen ähnliche Werte. In der Zentralregion zeigten die Mikroglia einen maximalen Verzweigungsgrad von $6,8$ [$6,2$ - $7,3$], in der Peripherie von $6,4$ [$5,9$ - $6,9$]. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Regionen ($p = 0,124$). Ähnlich verhielt es sich mit der Ordnung der Zellfortsätze in beiden Regionen. In der Zentralregion wiesen die Zellfortsätze maximal die Ordnung $4,1$ [$3,9$ - $4,3$], in der Peripherie maximal die Ordnung $4,0$ [$3,8$ - $4,1$] auf. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Regionen ($p = 0,332$). In beiden Regionen wiesen die Mikroglia eine ähnliche Anzahl an Zellfortsatzsegmenten auf ($p = 0,106$). Die Anzahl der Fortsatzsegmente in der Zentralregion betrug $29,0$ [$26,3$ - $31,7$], in der Peripherie $27,1$ [$24,6$ - $29,5$].

Auch die Anzahl an Fortsatzendpunkten pro Zelle war in beiden Regionen ähnlich ($p = 0,11$). Die Anzahl der Fortsatzendpunkte betrug in der Zentralregion $15,9$ [$14,5$ - $17,4$], in der Peripherie $14,9$ [$13,6$ - $16,2$].

Die Sholl-Analyse gibt Informationen über die Anzahl und Anordnung der Verzweigungen in einer bestimmten Distanz vom Zellkörper (Catalin et al. 2013). In beiden Regionen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von $30 \mu\text{m}$ auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der Zentralregion $353,9$ [$293,0$ - $414,8$], in der Peripherie $487,3$ [$430,4$ - $544,3$]. Die Mikroglia der Peripherie wiesen eine um $133,5$ [$50,1$ - $216,8$] höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den Sholl-Radien auf als die der Zentralregion ($p = 0,002$).

Durch das Vorkommen signifikanter Unterschiede in einigen morphologischen Parametern erfolgte deshalb für den Vergleich der Behandlungsgruppen eine getrennte statistische Auswertung für jede der beiden Regionen. Alle Daten wurden hierfür nach Region aufgeteilt und die Behandlungsgruppe als Faktor gesetzt.

6.2.2 Zentralregion

Innerhalb der Zentralregion erfolgte ein Vergleich der sechs Behandlungsgruppen ($n = 4$ / Gruppe). Es gingen nur vollständig detektierbare Zellen in die Betrachtung ein, sodass die Analyse eine unterschiedliche Anzahl an Zellen pro Retina auffasste: junge Kontrollgruppe ($n = 41$), alte Kontrollgruppe ($n = 50$), junge Depletionsgruppe ($n = 15$), alte Depletionsgruppe ($n = 22$), junge Regenerationsgruppe ($n = 60$) und alte Regenerationsgruppe ($n = 49$).

6.2.2.1 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia

Mikroglia der jungen und der alten Kontrollgruppe wurden verglichen, um alterungsabhängige Unterschiede in der mikroglialen Morphologie der retinalen Zentralregion darzustellen.

Beide Altersgruppen zeigten ähnliche Werte in der Gesamtlänge. Die junge Kontrollgruppe zeigte eine Gesamtlänge von $186,9 \mu\text{m}$ [$137,2\text{-}236,7 \mu\text{m}$], die alte von $206,0 \mu\text{m}$ [$157,2\text{-}254,7 \mu\text{m}$]. Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,980$) (s. Abbildung 11A). Die alte Kontrollgruppe zeigte eine größere territoriale Fläche ($3.175,7 \mu\text{m}^2$, [$2.272,7\text{-}4.078,6 \mu\text{m}^2$]) im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe ($2.786,1 \mu\text{m}^2$, [$1.869,8\text{-}3.702,4 \mu\text{m}^2$]). Einen signifikanten Unterschied gab es jedoch nicht ($p = 0,843$) (s. Abbildung 11B). Beim Volumen zeigten beide Kontrollgruppen ähnliche Werte. Die junge Kontrollgruppe wies ein Volumen von $6.625,3 \mu\text{m}^3$ [$3.419,4\text{-}9.831,1 \mu\text{m}^3$], die alte Kontrollgruppe von $7.164,0 \mu\text{m}^3$ [$3.994,5\text{-}10.333,5 \mu\text{m}^3$] auf. Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,880$) (s. Abbildung 11C).

In der Komplexität der Zellen zeigten beide Altersgruppen ähnliche Werte. Die junge Kontrollgruppe wies einen maximalen Verzweigungsgrad von $5,8$ [$4,6\text{-}7,1$] pro Zelle auf, die alte Kontrollgruppe von $7,4$ ($6,3\text{-}8,6$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,406$) (s. Abbildung 11D). Die maximale Ordnung der Fortsätze pro Zelle wies keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf ($p = 0,529$). Die junge Kontrollgruppe zeigte eine maximale Ordnung von $3,8$ [$3,3\text{-}4,2$], die alte Kontrollgruppe von $4,1$ [$3,6\text{-}4,5$] (s. Abbildung 11E). Die Anzahl an Fortsatzsegmenten pro Zelle betrug bei der jungen Kontrollgruppe $26,1$ [$18,7\text{-}33,4$], bei der alten Kontrollgruppe $31,3$ [$24,1\text{-}38,6$]. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,892$) (s. Abbildung 11F).

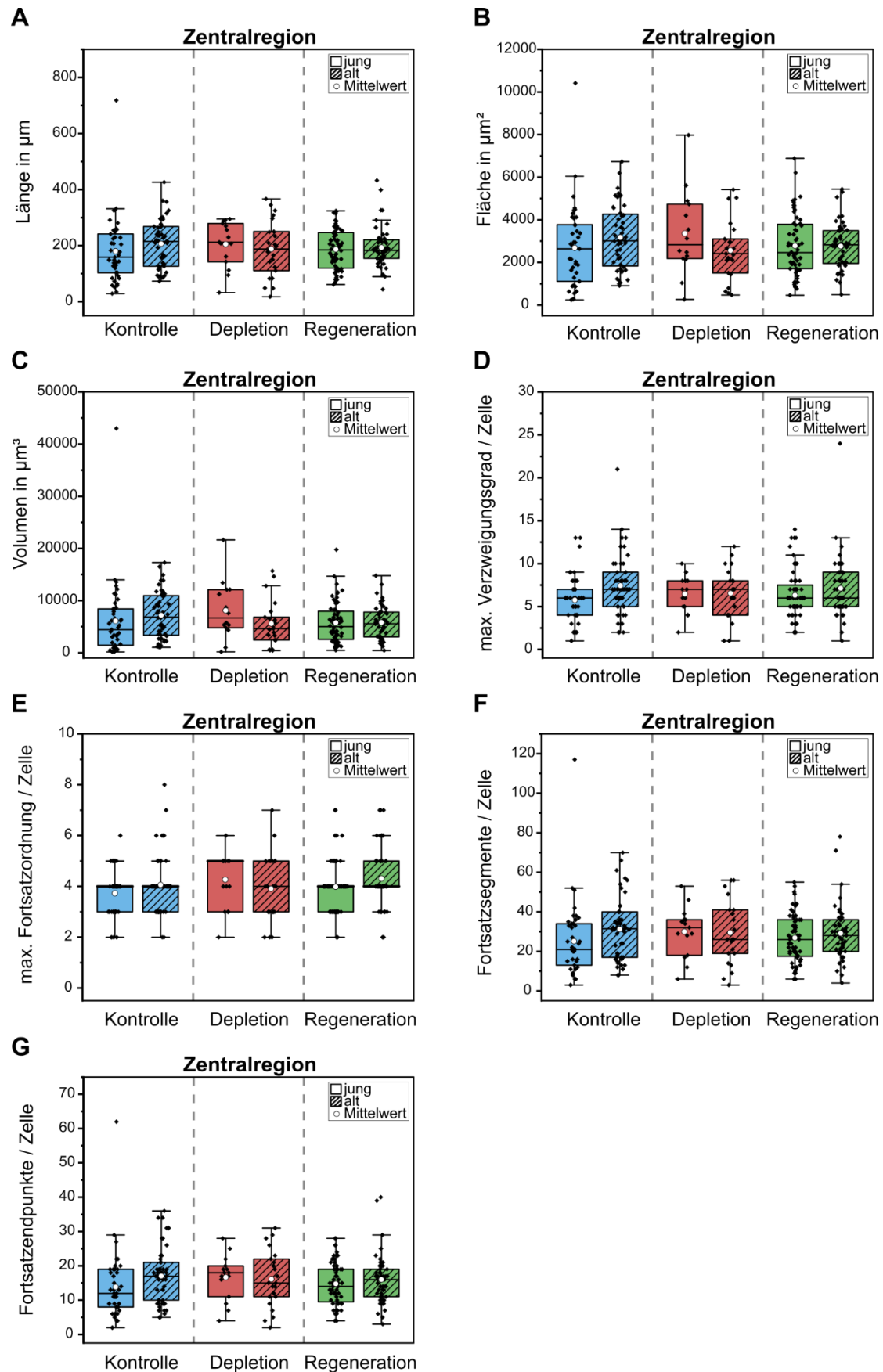


Abbildung 11: Analyse der mikroglialen Morphologie in der Zentralregion. Betrachtet wurden sieben verschiedene Parameter (A-G). Gemischtes lineares Modell mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

Auch die Anzahl der Fortsatzendpunkte pro Zelle ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen ($p = 0,894$). Die junge Kontrollgruppe wies 14,3 [10,4-18,3], die alte Kontrollgruppe 17,0 [13,2-20,9] Fortsatzendpunkte pro Zelle auf (s. Abbildung 11G).

Die Anzahl der Schnittpunkte der Zellfortsätze pro Sholl-Radius wurde graphisch dargestellt (s. Abbildung 12A). In beiden Altersgruppen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von 30 μm auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der jungen Kontrollgruppe 310,7 [208,6-412,7], in der alten Kontrollgruppe 431,9 [329,9-534,0] (vgl. Abbildung 13). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen ($p = 0,541$). Anhand der gewählten Parameter ließen sich somit keine morphologischen Unterschiede zwischen jungen und alten Mikroglia innerhalb der Zentralregion aufweisen.

6.2.2.2 Charakterisierung der nicht depletierten Zellen

Nach Absetzen des CSF1R-Inhibitors verblieben einige Mikroglia in der Retina. Es erfolgte eine Charakterisierung dieser nicht depletierten Zellen in der Zentralregion und ein Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen.

Beide Depletionsgruppen wiesen ähnliche Werte in der Gesamtlänge der Zellen auf. Die junge Depletionsgruppe zeigte eine Länge von 203,4 μm [139,8-266,9 μm], die alte Depletionsgruppe von 184,3 μm [129,7-238,9 μm]. Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,98$) (s. Abbildung 11A). Die junge Depletionsgruppe wies eine etwas größere territoriale Fläche (3.323,2 μm^2 , [2.155,8-4.490,6 μm^2]) im Vergleich zur alten Depletionsgruppe auf (2.670,0 μm^2 , [1.469,6-3.470,3 μm^2]). Signifikant war der Unterschied jedoch nicht. Auch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu den Kontrollgruppen ($p = 0,843$) (s. Abbildung 11B). Ähnlich verhielt es sich im Volumen. Die junge Depletionsgruppe wies ein Volumen von 7.958,9 μm^3 [3.964,7-11.953,1 μm^3], die alte Depletionsgruppe von 5.243,2 μm^3 [1.809,6-8.676,9 μm^3] auf. Der Unterschied erwies sich weder zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen als signifikant ($p = 0,880$) (s. Abbildung 11C). Die junge Depletionsgruppe [4,7-8,2] wies wie die alte Depletionsgruppe [5,0-8,1] einen maximalen Verzweigungsgrad von 6,5 auf. Es gab ebenso keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen ($p = 0,406$) (s. Abbildung 11D).

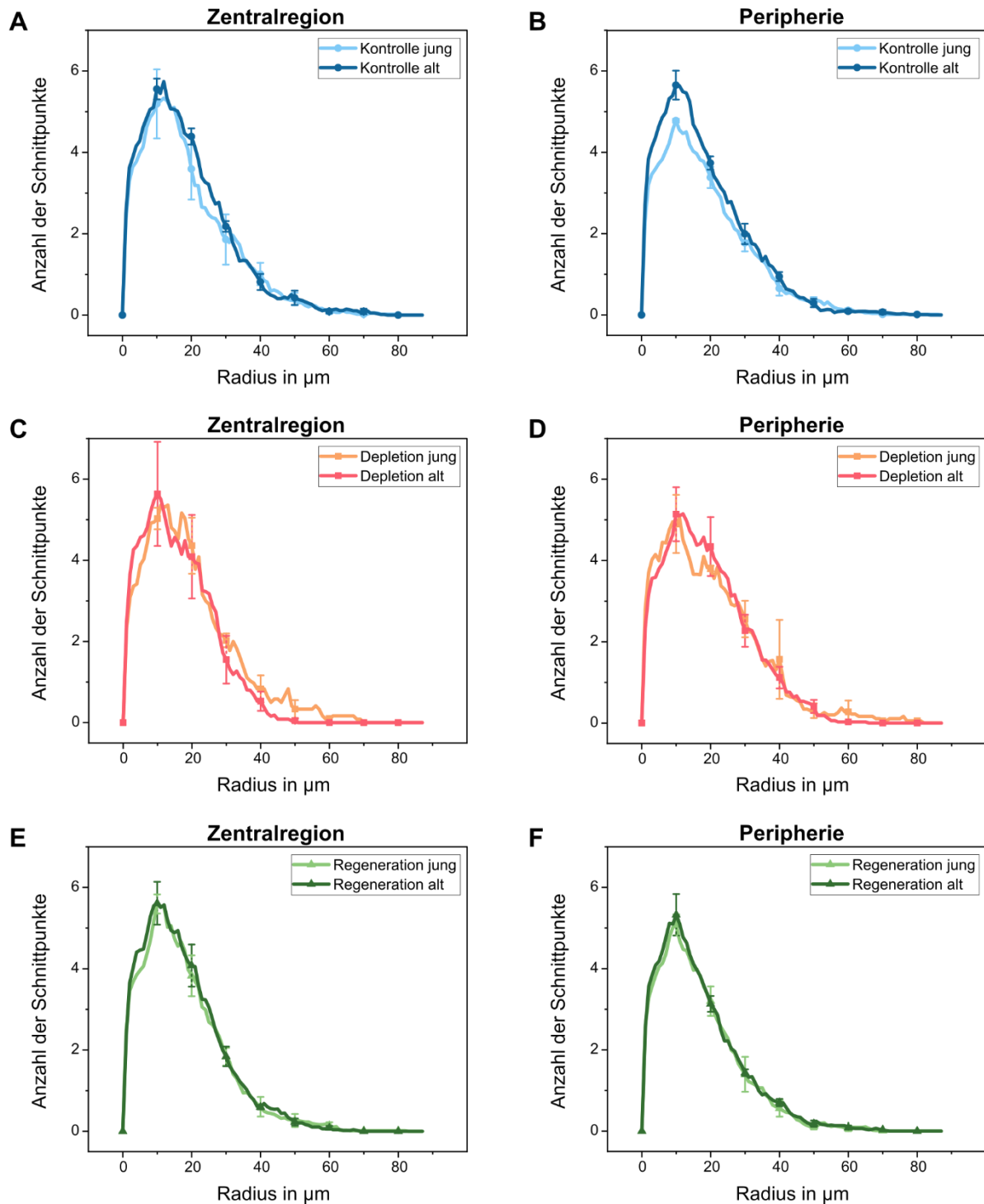


Abbildung 12: Graphische Darstellung der Sholl-Analyse. Es erfolgte eine getrennte Auswertung der Behandlungsgruppen in der retinalen Zentralregion (A, C, E) und der retinalen Peripherie (B, D, F).

Die maximale Ordnung der Fortsätze pro Zelle wies weder einen Unterschied zwischen den beiden Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen auf ($p = 0,529$). Die junge Depletionsgruppe wies eine maximale Ordnung von 4,3 [3,6-4,9] auf, die alte Depletionsgruppe von 3,9 [3,3-4,4] (s. Abbildung 11E). Die Anzahl der Fortsatzsegmente betrug in der jungen Depletionsgruppe 29,9 [20,1-39,7], in der alten

Depletionsgruppe 29,2 [20,8-37,6]. Es gab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,892$) (s. Abbildung 11F). Auch die Anzahl der Fortsatzendpunkte pro Zelle ergab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,894$). Bei der jungen Depletionsgruppe betrug die Anzahl der Fortsatzendpunkte 16,6 [11,4-21,8], bei der alten Depletionsgruppe 16,0 [11,6-20,4] (s. Abbildung 11G).

Die Anzahl der Schnittpunkte der Zellfortsätze pro Sholl-Radius wurde graphisch dargestellt (s. Abbildung 12C). In beiden Depletionsgruppen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von 30 μm auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der jungen Depletionsgruppe 326,7 [154,9-498,5], in der alten Depletionsgruppe 296,7 [163,6-429,8] (vgl. Abbildung 13). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Depletionsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen ($p = 0,789$).

Anhand der gewählten Parameter ließen sich somit keine morphologischen Unterschiede weder zwischen der jungen und alten Depletionsgruppe noch zwischen den Depletionsgruppen und den Kontrollgruppen innerhalb der Zentralregion aufweisen.

6.2.2.3 Charakterisierung der regenerierten Mikroglia

Beide Regenerationsgruppen zeigten ähnliche Werte in der Gesamtlänge der Zellen, ebenso wie im Vergleich zu den Kontrollgruppen ($p = 0,980$). Die junge Regenerationsgruppe wies eine Länge von 187,1 μm [138,8-235,5 μm] auf, die alte Regenerationsgruppe von 193,5 μm [144,7-242,3 μm] (s. Abbildung 11A). Ähnlich verhielt es sich in der Fläche ($p = 0,843$) und im Volumen ($p = 0,880$) (s. Abbildung 11B,C). Bei der jungen Regenerationsgruppe betrug die Fläche 2.791,7 μm^2 [1.898,7-3.684,7 μm^2] und das Volumen 5.927,3 μm^3 [2.784,6-9.070,0 μm^3]. Bei der alten Regenerationsgruppe betrug die Fläche 2.758,8 μm^2 [1.856,0-3.661,5 μm^2] und das Volumen 5.779,0 μm^3 [2.610,1-8.947,9 μm^3].

Auch in den Komplexitätsparametern zeigten beide Regenerationsgruppen ähnliche Werte (s. Abbildung 11D-G). Der maximale Verzweigungsgrad betrug 6,3 [5,2-7,5] in der jungen und 7,1 [6,0-8,3] in der alten Regenerationsgruppe. Es gab keinen signifikanten Unterschied weder zwischen den Regenerationsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,406$).

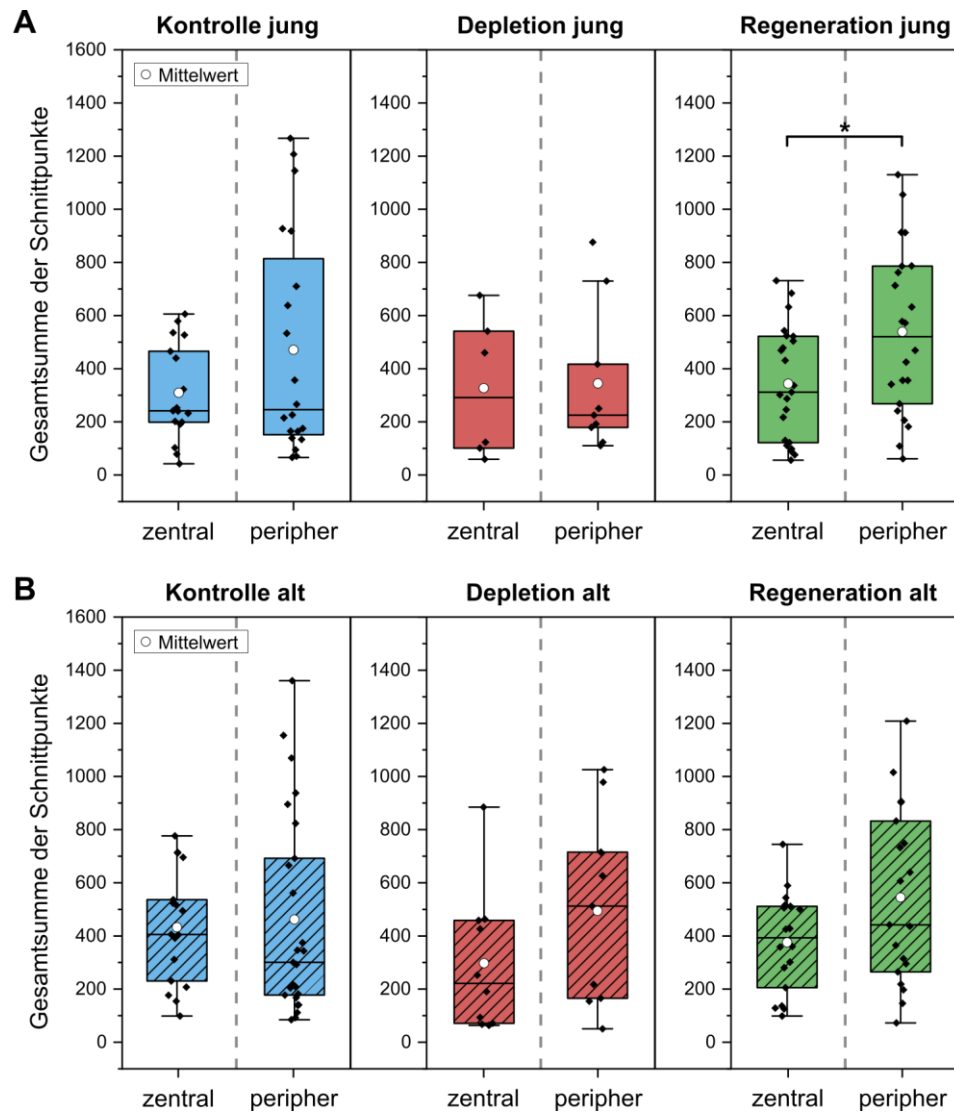


Abbildung 13: Vergleich zwischen Zentralregion und Peripherie. Analyse der Gesamtsumme der Schnittpunkte der Zellfortsätze mit den Sholl-Radien innerhalb jeder Behandlungsgruppe. Gemischtes lineares Modell mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

Die junge Regenerationsgruppe wies eine maximale Ordnung der Fortsätze von 4,0 [3,6-4,4] auf, die alte Regenerationsgruppe von 4,3 [3,9-4,8]. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Regenerationsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen ($p = 0,529$). Die Anzahl der Fortsatzsegmente betrug 26,9 [19,8-34,1] in der jungen und 29,2 [22,0-36,4] in der alten Regenerationsgruppe. Es gab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Regenerationsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,892$). Die Anzahl der Fortsatzendpunkte betrug in der jungen Regenerationsgruppe 14,8 [11,0-18,6] und 16,1 [12,2-19,9] in der alten Regenerationsgruppe. Es gab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Regenerationsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,894$).

Die Anzahl der Schnittpunkte der Zellfortsätze pro Sholl-Radius wurde graphisch dargestellt (s. Abbildung 12E). In beiden Regenerationsgruppen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von 30 μm auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der jungen Regenerationsgruppe 343,6 [255,8-431,3], in der alten Regenerationsgruppe 375,1 [275,9-474,3] (vgl. Abbildung 13). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Regenerationsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen ($p = 0,541$).

Anhand der gewählten Parameter ließen sich keine morphologischen Unterschiede weder zwischen der jungen und alten Regenerationsgruppe noch zwischen den Regenerationsgruppen und den Kontrollgruppen innerhalb der Zentralregion aufweisen.

6.2.3 Peripherie

Innerhalb der Peripherie erfolgte ein Vergleich der sechs Behandlungsgruppen ($n = 4$ / Gruppe). Es gingen nur vollständig detektierbare Zellen in die Betrachtung ein, sodass die Analyse eine unterschiedliche Anzahl an Zellen pro Retina auffasste: junge Kontrollgruppe ($n = 77$), alte Kontrollgruppe ($n = 84$), junge Depletionsgruppe ($n = 23$), alte Depletionsgruppe ($n = 31$), junge Regenerationsgruppe ($n = 106$) und alte Regenerationsgruppe ($n = 86$).

6.2.3.1 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia

Mikroglia der jungen und der alten Kontrollgruppe wurden verglichen, um alterungsabhängige Unterschiede in der mikroglialen Morphologie der retinalen Peripherie darzustellen.

Beide Altersgruppen zeigten ähnliche Werte in der Gesamtlänge. Die junge Kontrollgruppe zeigte eine Gesamtlänge von 172,3 μm [139,4-205,2 μm], die alte von 194,1 μm [161,5-226,6 μm] (s. Abbildung 14A). Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,409$). Die alte Kontrollgruppe zeigte mit 2.831,8 μm^2 [2.197,9-3.465,7 μm^2] eine geringfügig größere territoriale Fläche als die junge Kontrollgruppe mit 2.575,1 μm^2 [1.934,9-3.215,3 μm^2]. Einen signifikanten Unterschied gab es jedoch nicht ($p = 0,360$) (s. Abbildung 14B). Ähnlich verhielt es sich beim Volumen. Die junge Kontrollgruppe wies ein Volumen von 5.737,2 μm^3 [3.480,2-7.994,2 μm^3], die alte Kontrollgruppe von 6.181,3 μm^3 [3.942,7-8.420,0 μm^3] auf. Es gab keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,706$) (s. Abbildung 14C).

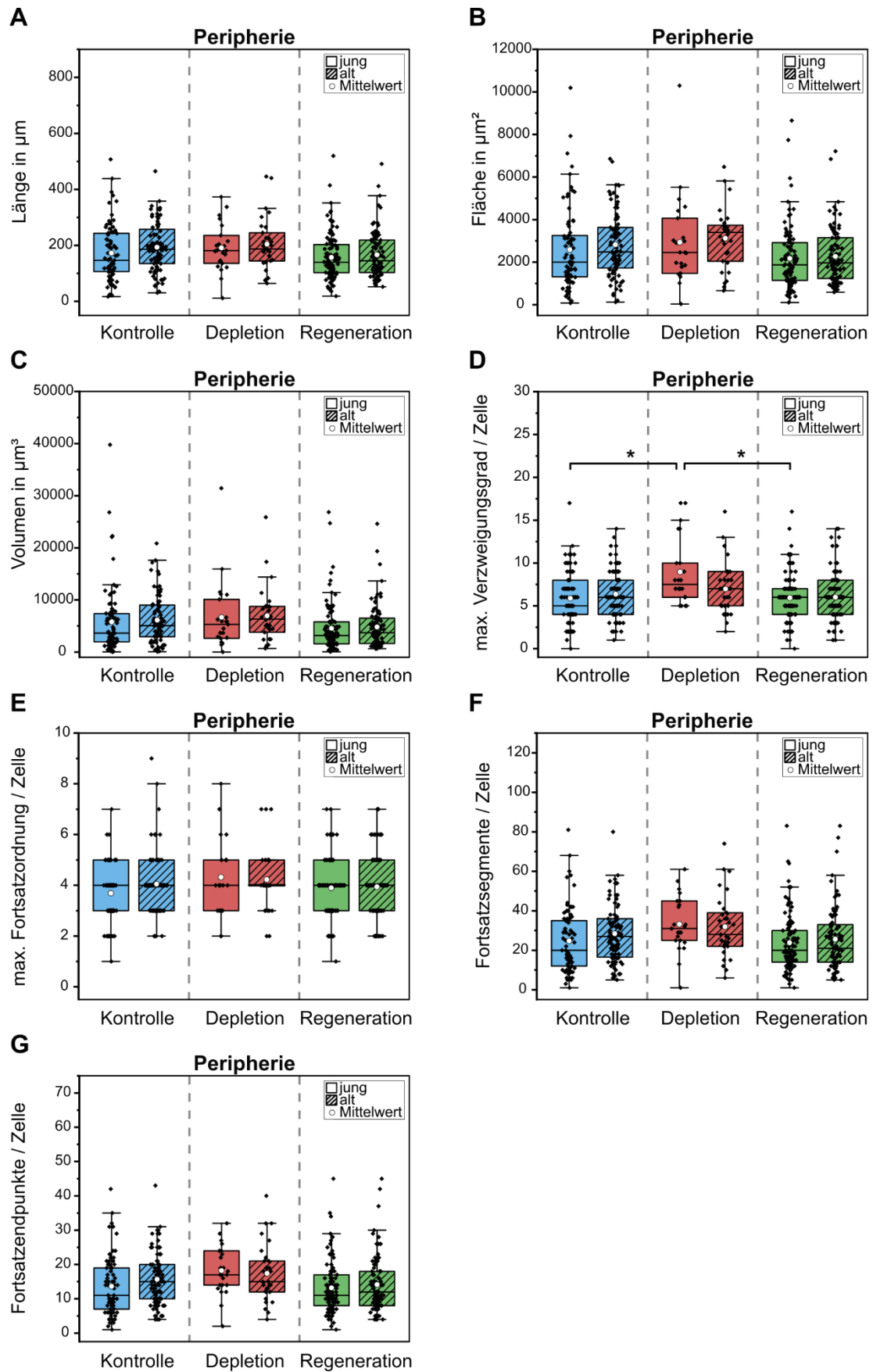


Abbildung 14: Analyse der mikroglialen Morphologie in der Peripherie. Betrachtet wurden sieben verschiedene Parameter (A-G). Gemischtes lineares Modell mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

In der Komplexität der Zellen zeigten beide Altersgruppen ähnliche Werte (s. Abbildung 14D-G). Die junge Kontrollgruppe wies einen maximalen Verzweigungsgrad von 5,9 [4,9-6,9] pro Zelle auf, die alte Kontrollgruppe von 6,4 [5,4-7,4]. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 1,0$). Auch die maximale Ordnung der Fortsätze pro Zelle wies keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf ($p = 0,416$). Die junge Kontrollgruppe zeigte eine maximale Ordnung von 3,7 [3,3-4,1], die alte Kontrollgruppe von 4,1 [3,7-4,4]. Die Anzahl an Fortsatzsegmenten pro Zelle betrug bei der jungen Kontrollgruppe 24,7 [19,4-29,9], bei der alten Kontrollgruppe betrug sie 28,6 [23,4-33,7]. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p = 0,208$). Auch die Anzahl der Fortsatzendpunkte pro Zelle ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen ($p = 0,183$). Die junge Kontrollgruppe wies 13,6 [10,9-16,3], die alte Kontrollgruppe 15,8 [13,2-20,9] Fortsatzendpunkte pro Zelle auf.

Die Anzahl der Schnittpunkte der Zellfortsätze pro Sholl-Radius wurde graphisch dargestellt (s. Abbildung 12B). In beiden Altersgruppen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von 30 μm auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der jungen Kontrollgruppe 475,4 [279,7-671,2], in der alten Kontrollgruppe 475,4 [287,2-663,7] (vgl. Abbildung 13). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Altersgruppen ($p = 0,786$).

Anhand der gewählten Parameter ließen sich somit keine morphologischen Unterschiede zwischen jungen und alten Mikroglia innerhalb der Peripherie aufweisen.

6.2.3.2 Charakterisierung der nicht depletierten Zellen

Nach Absetzen des CSF1R-Inhibitors verblieben einige Mikroglia in der Retina. Es erfolgte eine Charakterisierung dieser nicht depletierten Zellen in der Peripherie und ein Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen.

Beide Depletionsgruppen wiesen ähnliche Werte in der Gesamtlänge der Zellen auf. Die junge Depletionsgruppe zeigte eine Länge von 190,9 μm [145,1-236,6 μm], die alte Depletionsgruppe von 203,6 μm [164,1-243,0 μm]. Es gab weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,409$) (s. Abbildung 14A). Die junge Depletionsgruppe wies eine territoriale Fläche von 2.934,9 μm^2 [2.070,2-3.799,6 μm^2] auf, die alte von 3.105,6 μm^2 [2.352,8-3.858,4 μm^2]. Es zeigte sich weder ein signifikanter Unterschied zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,360$) (s. Abbildung 14B).

Beim Volumen zeigten beide Depletionsgruppen ähnliche Werte. Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,706$). Das Volumen der jungen Depletionsgruppe betrug $6.665,3 \mu\text{m}^3$ [$3.690,7-9.639,8 \mu\text{m}^3$], das Volumen der alten Depletionsgruppe betrug $6.861,9 \mu\text{m}^3$ [$4.273,9-9.449,8 \mu\text{m}^3$] (s. Abbildung 14C).

In der Komplexität der Zellen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Depletionsgruppen (vgl. Abbildung 14D-G). Die junge Depletionsgruppe wies einen maximalen Verzweigungsgrad von 9,0 [$7,5-10,5$] auf, die alte Depletionsgruppe dagegen nur von 7,0 [$5,7-8,2$]. Der Unterschied war aber nicht signifikant ($p = 0,564$). Es gab allerdings einen signifikanten Unterschied zur jungen Kontrollgruppe. Die junge Depletionsgruppe wies einen um 3,1 ($0,4-5,9$) höheren Verzweigungsgrad auf als die junge Kontrollgruppe (9,0 [$7,5-10,5$] vs. 5,9 [$4,9-6,9$], $p = 0,016$) (s. Abbildung 14D).

Die maximale Ordnung der Fortsätze pro Zelle wies weder Unterschiede zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen auf ($p = 0,416$). Die junge Depletionsgruppe wies eine maximale Ordnung von 4,3 [$3,7-4,9$] auf, die alte Depletionsgruppe von 4,2 [$3,7-4,7$]. Die Anzahl der Fortsatzsegmente betrug in der jungen Depletionsgruppe 33,2 [$25,7-40,6$], in der alten Depletionsgruppe 31,8 [$25,4-38,3$]. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Depletionsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen ($p = 0,208$). Auch die Anzahl der Fortsatzendpunkte pro Zelle ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Depletionsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen ($p = 0,183$). Bei der jungen Depletionsgruppe betrug die Anzahl der Fortsatzendpunkte 18,2 [$14,3-22,1$], bei der alten Depletionsgruppe 17,4 [$14,0-20,7$].

Die Anzahl der Schnittpunkte der Zellfortsätze pro Sholl-Radius wurde graphisch dargestellt (s. Abbildung 12D). In beiden Depletionsgruppen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von $30 \mu\text{m}$ auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der jungen Depletionsgruppe 348,5 [$85,7-611,3$], in der alten Depletionsgruppe 497,0 [$245,0-749,0$] (s. Abbildung 13). Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen den Depletionsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,786$).

Anhand der gewählten Parameter ließen sich somit keine morphologischen Unterschiede zwischen der jungen und alten Depletionsgruppe in der Peripherie aufweisen. Es gab allerdings einen signifikanten Unterschied im maximalen Verzweigungsgrad zwischen der jungen Depletions- und der jungen Kontrollgruppe.

6.2.3.3 Charakterisierung der regenerierten Mikroglia

Beide Regenerationsgruppen zeigten ähnliche Werte in der Gesamtlänge der Zellen. Es gab keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen ($p = 0,409$). Die junge Regenerationsgruppe wies eine Länge von $160,5 \mu\text{m}$ [$128,5\text{-}192,4 \mu\text{m}$] auf, die alte von $166,7 \mu\text{m}$ [$134,2\text{-}199,3 \mu\text{m}$] (s. Abbildung 14A). Ähnlich verhielt es sich in der Fläche ($p = 0,360$) und im Volumen ($p = 0,706$). Bei der jungen Regenerationsgruppe betrug die Fläche $2.240,3 \mu\text{m}^2$ [$1.617,3\text{-}2.863,4 \mu\text{m}^2$] und das Volumen $4.805,8 \mu\text{m}^3$ [$2.598,7\text{-}7.012,9 \mu\text{m}^3$]. Bei der alten Regenerationsgruppe betrug die Fläche $2.277,9 \mu\text{m}^2$ [$1.643,5\text{-}2.912,2 \mu\text{m}^2$] und das Volumen $4.846,9 \mu\text{m}^3$ [$2.606,8\text{-}7.087,0 \mu\text{m}^3$] (s. Abbildung 14B,C).

Ebenso in den Komplexitätsparametern zeigten beide Regenerationsgruppen ähnliche Werte (vgl. Abbildung 14D-G). Der maximale Verzweigungsgrad betrug $6,0$ [$5,1\text{-}7,0$] in der jungen Regenerationsgruppe und $6,0$ [$5,0\text{-}7,0$] in der alten Regenerationsgruppe. Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen den Regenerationsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 1,0$). Es gab aber einen signifikanten Unterschied im maximalen Verzweigungsgrad zwischen der jungen Regenerationsgruppe und der jungen Depletionsgruppe. Die junge Depletionsgruppe wies einen um $3,0$ [$0,3\text{-}5,7$] höheren Verzweigungsgrad auf als die junge Regenerationsgruppe ($9,0$ [$7,5\text{-}10,5$] vs. $6,0$ [$5,0\text{-}7,0$], $p = 0,023$) (vgl. Abbildung 14D). Die junge Regenerationsgruppe wies eine maximale Ordnung der Fortsätze von $3,9$ [$3,6\text{-}4,3$] auf, die alte Regenerationsgruppe von $3,9$ [$3,6\text{-}4,3$]. Es gab weder signifikante Unterschiede zwischen den Regenerationsgruppen noch zu den Kontrollgruppen ($p = 0,416$). Die Anzahl der Fortsatzsegmente betrug $24,3$ [$19,3\text{-}29,4$] in der jungen Regenerationsgruppe und $25,7$ [$20,6\text{-}30,9$] in der alten Regenerationsgruppe ($p = 0,208$). Die Anzahl der Fortsatzendpunkte betrug in der jungen Regenerationsgruppe $13,4$ [$10,9\text{-}16,0$] und $14,2$ [$11,5\text{-}16,8$] in der alten Regenerationsgruppe ($p = 0,183$).

Die Anzahl der Schnittpunkte der Zellfortsätze pro Sholl-Radius wurde graphisch dargestellt (s. Abbildung 12F). In beiden Regenerationsgruppen wiesen die Mikroglia die meisten Schnittpunkte in der Nähe des Zellkerns bis zu einem Radius von $30 \mu\text{m}$ auf. Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der jungen Regenerationsgruppe $556,3$ [$362,7\text{-}749,9$], in der alten Regenerationsgruppe $563,7$ [$362,8\text{-}764,6$] (s. Abbildung 13). Beide Gruppen zeigten geringfügig höhere Werte als ihre Kontrollgruppen. Signifikant waren die Unterschiede jedoch nicht ($p = 0,786$).

Anhand der gewählten Parameter ließen sich keine morphologischen Unterschiede weder zwischen der jungen und alten Regenerationsgruppe noch zwischen den Regenerationsgruppen und den Kontrollgruppen innerhalb der Peripherie aufweisen. Nur im maximalen Verzweigungsgrad zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der jungen Regenerations- und der jungen Depletionsgruppe.

6.2.4 Vergleich Zentralregion zu Peripherie innerhalb jeder Behandlungsgruppe

Da sich die Mikroglia in der anfangs durchgeführten Analyse über alle Behandlungsgruppen hinweg in der Zentralregion und der Peripherie in einigen morphologischen Parametern signifikant unterschieden, wurde zusätzlich eine getrennte Analyse der Parameter innerhalb jeder Behandlungsgruppe durchgeführt. Dafür erfolgte eine Aufteilung aller Daten nach den Behandlungsgruppen mit anschließender statistischer Auswertung eines gemischten linearen Modells. Innerhalb der Behandlungsgruppen wurde hierbei die Region als Faktor gesetzt. Bei dieser Neubetrachtung der gleichen Daten kam es nur zu geringen und daher vernachlässigbaren Abweichungen im Vergleich zu den bereits bekannten Ergebnissen. Deshalb werden im Folgenden nur die signifikanten Unterschiede aus dem Vergleich Zentralregion zu Peripherie innerhalb einer jeden Behandlungsgruppe aufgeführt. Angegeben werden die aus dem Modell ermittelten Mittelwerte mit 95 %-Konfidenzintervall (Mittelwert, [95 %-Konfidenzintervall]). Die graphische Darstellung der Sholl-Analyse im Regionsvergleich ist in Abbildung 16 dargestellt.

6.2.4.1 Junge Depletionsgruppe

Innerhalb der jungen Depletionsgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied im maximalen Verzweigungsgrad zwischen den Regionen. Dieser war in der Peripherie um 2,6 [0,4-4,8] höher als in der Zentralregion ($p = 0,021$). Mikroglia in der Zentralregion wiesen einen maximalen Verzweigungsgrad von 6,4 [3,5-9,3] auf, in der Peripherie dagegen von 9,0 [5,9-12,2] (s. Abbildung 15D).

6.2.4.2 Junge Regenerationsgruppe

Innerhalb der jungen Regenerationsgruppe zeigten sich einige signifikante Unterschiede zwischen den Regionen. Mikroglia in der Zentralregion waren um 29,0 μm [5,2-52,8 μm] länger als in der Peripherie ($p = 0,017$).

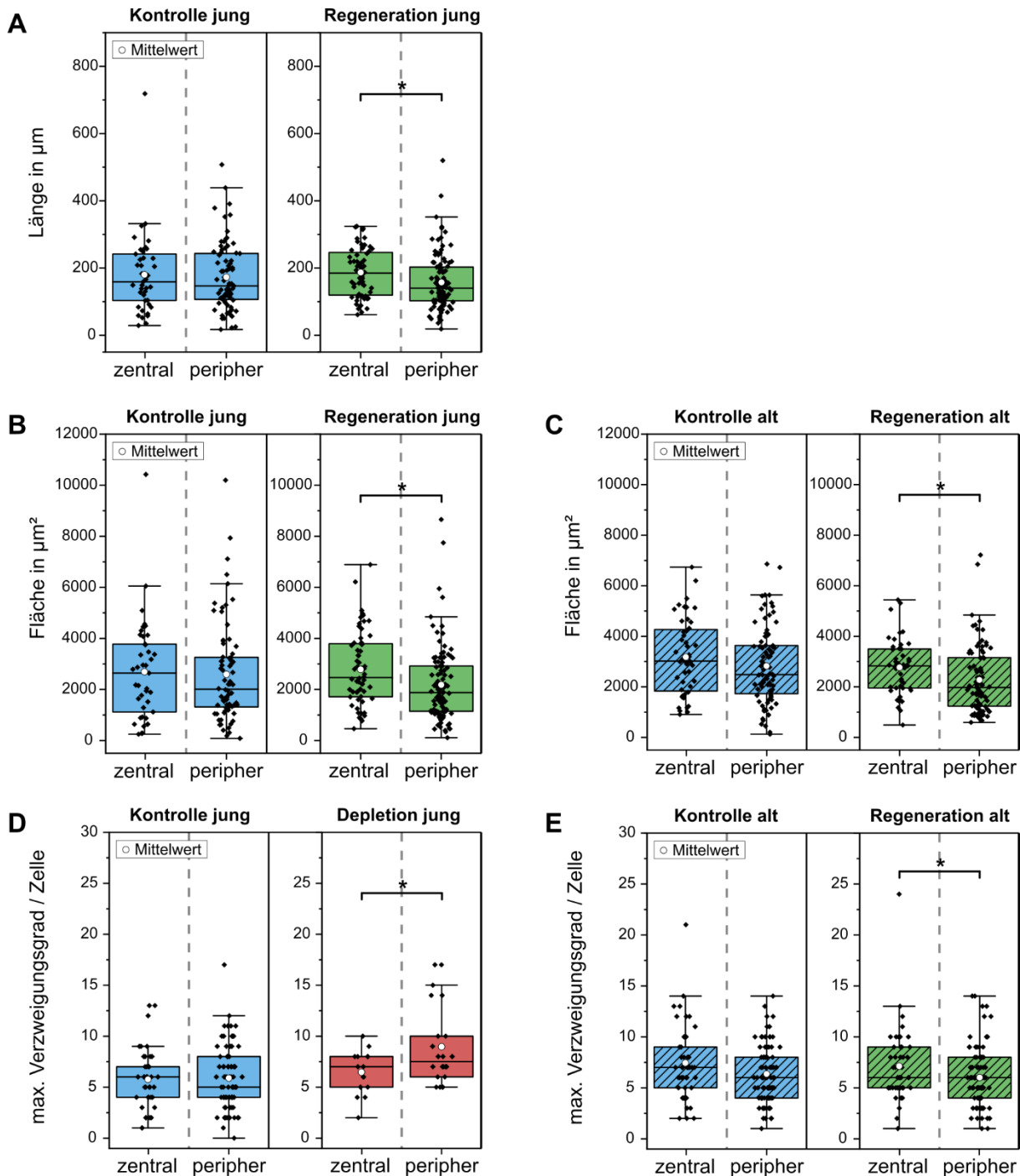


Abbildung 15: Vergleich der mikroglialen Morphologie zwischen Zentralregion und Peripherie innerhalb jeder Behandlungsgruppe. Dargestellt werden nur die signifikanten Ergebnisse im Zusammenhang mit ihrer jeweiligen Kontrollgruppe. Gemischtes lineares Modell mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

In der Zentralregion wiesen Mikroglia eine Länge von $190,0 \mu\text{m}$ [$137,1\text{-}243,0 \mu\text{m}$] auf, in der Peripherie von $161,0 \mu\text{m}$ [$105,5\text{-}216,6 \mu\text{m}$] (s. Abbildung 15A). Mikroglia nahmen eine Fläche von $2.829,1 \mu\text{m}^2$ [$1.692,2\text{-}3.966,0 \mu\text{m}^2$] in der Zentralregion und von $2.253,2 \mu\text{m}^2$ [$1071,7\text{-}3.434,6 \mu\text{m}^2$] in der Peripherie ein. Mikroglia in der Zentralregion nahmen daher eine um $575,9 \mu\text{m}^2$ [$149,6\text{-}1.002,2 \mu\text{m}^2$] größere Fläche

ein als in der Peripherie ($p = 0,008$) (s. Abbildung 15B). Die Gesamtsumme der Schnittpunkte betrug in der Zentralregion 352,3 [150,7-553,8], in der Peripherie 560,6 [359,3-761,9]. Mikroglia der Peripherie wiesen eine um 208,4 [56,2-360,5] höhere Anzahl an Schnittpunkten mit den Sholl-Radien auf als die der Zentralregion (s. Abbildung 13A). Der Unterschied zwischen den Regionen war statistisch signifikant ($p = 0,009$).

6.2.4.3 Alte Regenerationsgruppe

Innerhalb der alten Regenerationsgruppe zeigten sich ebenfalls einige signifikante Unterschiede zwischen den Regionen. In der Zentralregion wiesen Mikroglia eine Fläche von $2.765,1 \mu\text{m}^2$ [2.409,0-3.121,3 μm^2] auf und von $2.269,3 \mu\text{m}^2$ [2.000,0-2.538,5 μm^2] in der Peripherie. Mikroglia in der Zentralregion nahmen eine um $495,9 \mu\text{m}^2$ [49,4-942,3 μm^2] größere Fläche ein als in der Peripherie ($p = 0,030$) (s. Abbildung 15C).

Der maximalen Verzweigungsgrad war in der Zentralregion um 1,1 [0,04-2,2] höher als in der Peripherie ($p = 0,021$). Mikroglia in der Zentralregion wiesen einen maximalen Verzweigungsgrad von 7,1 [5,8-8,5], in der Peripherie dagegen von 6,0 [4,6-7,4] auf (s. Abbildung 15E).

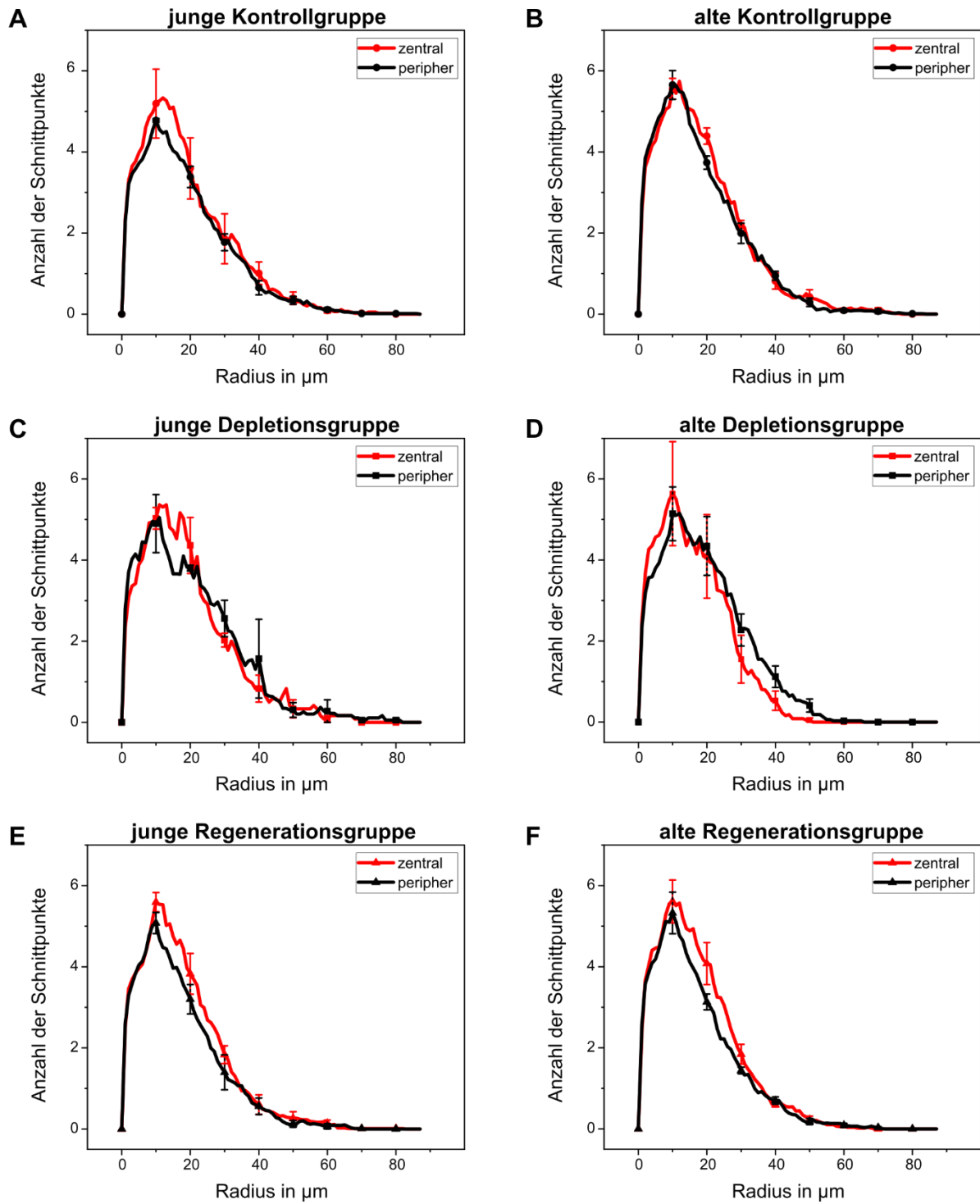


Abbildung 16: Graphische Darstellung der Sholl-Analyse im Vergleich der Zentralregion und Peripherie innerhalb jeder Behandlungsgruppe.

6.3 Genexpressionsanalyse in den Retinae junger und alter Mäuse

Zuerst wurde ermittelt, ob die Retinae junger und alter Mäuse eine unterschiedliche Genexpression aufweisen. Im Anschluss erfolgte die Untersuchung, ob die Entfernung der Mikroglia einen Einfluss auf die Genexpression des restlichen Gewebes der Retina hat. Als letztes wurde untersucht, ob die mikrogliale Repopulation und Regeneration der Retina eine Auswirkung auf die Genexpression der Retina hat.

Die untersuchten Gene wurden vier unterschiedlichen Funktionsgruppen zugeteilt. Als proinflammatorische Gene und Marker mikroglialer Aktivierung wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α ausgewählt. Als Vertreter antiinflammatorischer Zytokine wurde IL-10 untersucht. CD68 wurde als Marker für mikrogliale Aktivierung und Phagozytoseaktivität ausgewählt. Zusätzlich wurden die Tumorsuppressorgene und Seneszenzmarker p16^{Ink4a} (p16), p21 und p53 untersucht. Jedes Gen wurde nur einmal analysiert. Jede Behandlungsgruppe bestand aus drei bis vier Mäusen (n = 3-4). Insgesamt wurden die Werte von 22 Mäusen statistisch ausgewertet.

Im Folgenden sind alle Werte als Median mit Interquartilsabstand angegeben (Median (Interquartilsabstand)). Aufgrund von technischen Abweichungen wurden fünf Werte aus der statistischen Auswertung ausgeschlossen. Waren in einer Behandlungsgruppe nur zwei oder drei Werte vorhanden, wurden Minimum und Maximum statt des Interquartilsabstands angegeben (Median (Minimum-Maximum)). Alle Werte beziehen sich auf die Genexpression aller Zellen der Retina und nicht auf einen speziellen Zelltyp.

6.3.1 Alterungsabhängiger Effekt

In dieser Arbeit wurde ermittelt, ob ein alterungsabhängiger Unterschied in der Genexpression der ausgewählten Gene in der Retina besteht und durch eine qPCR nachweisbar ist.

6.3.1.1 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

IL-1 β war in der alten Kontrollgruppe mit einer Expressionsrate von 1,79 (1,6-2,4) etwas höher exprimiert als in der jungen Kontrollgruppe mit 0,97 (0,89-1,08) (s. Abbildung 17A). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich nicht ($p = 0,128$).

Ebenso zeigte TNF- α eine vermehrte Expressionsrate in der alten Kontrollgruppe (2,61 (2,32-2,74)) als in der jungen (1,02 (0,43)) (s. Abbildung 17B). Es ergab sich aber kein

signifikanter Unterschied ($p = 0,233$). IL-6 war dagegen in beiden Altersgruppen ähnlich exprimiert ($p = 0,184$). Die junge Kontrollgruppe wies eine Expressionsrate von 1,03 (0,13), die alte Kontrollgruppe von 1,14 (1,08-1,17) auf (s. Abbildung 17C).

6.3.1.2 Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

In beiden Altersgruppen wurde das antiinflammatorische Zytokin IL-10 gleich stark exprimiert ($p = 0,312$). Die junge Kontrollgruppe zeigte eine Expressionsrate von 1,01 (0,13), die alte Kontrollgruppe von 1,03 (0,98-1,08) (s. Abbildung 17D).

6.3.1.3 Expression des Phagozytosemarkers CD68

Die alte Kontrollgruppe zeigte mit 2,14 (2,03-2,16) eine zweifach so hohe Expressionsrate von CD68 wie die junge Kontrollgruppe mit 1,01 (0,33). Der Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen erwies sich als signifikant ($p = 0,029$) (s. Abbildung 18A).

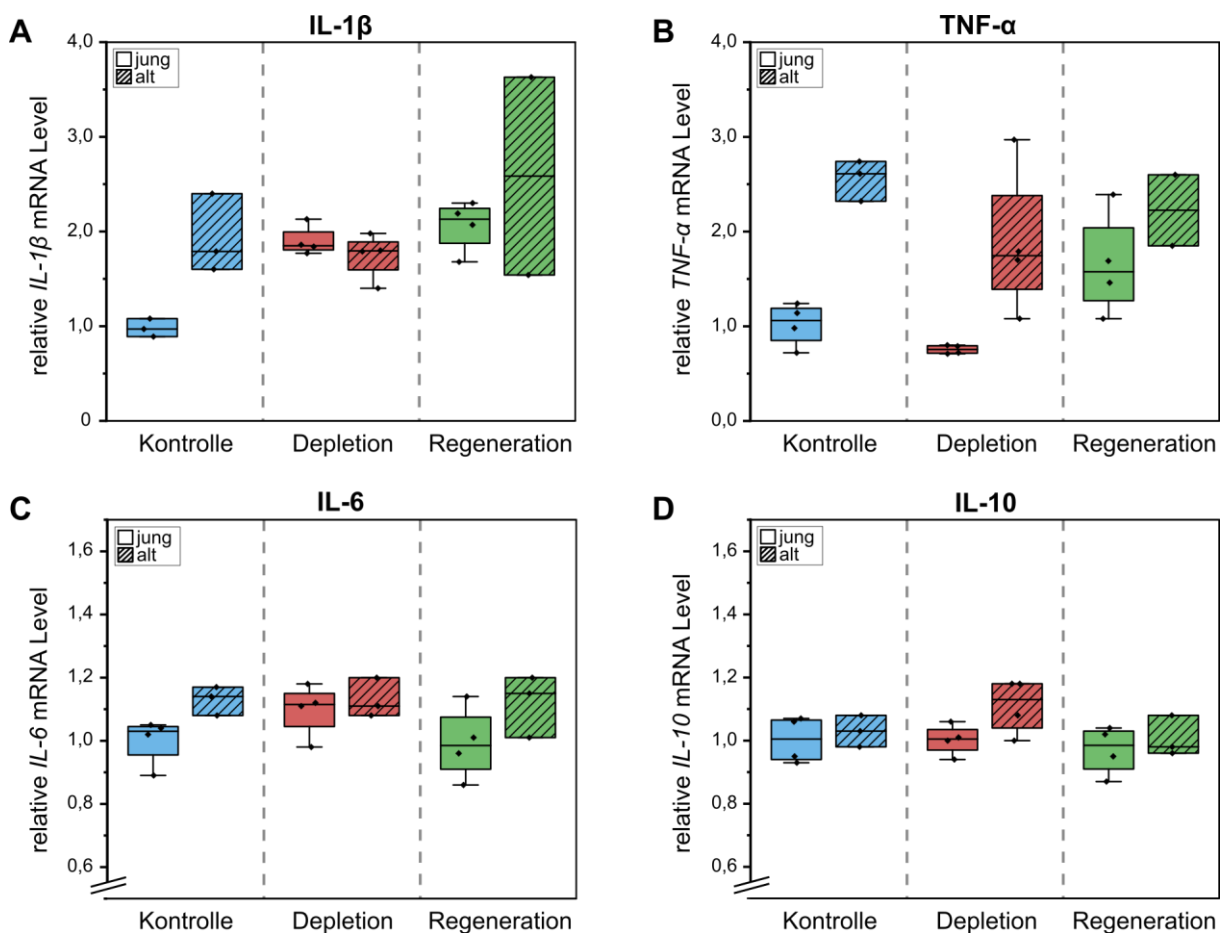


Abbildung 17: Relative Expressionsraten der analysierten Gene: proinflammatorische (A-C) und antiinflammatorische Zytokine (D). Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

6.3.1.4 Expression der Seneszenzmarker p16, p21 und p53

Die alte Kontrollgruppe wies eine zweifach höhere Expressionsrate von p16 auf als die junge Kontrollgruppe (2,5 (2,41-2,63) vs. 1,03 (0,26)). Der Unterschied zwischen den beiden Altersgruppen erwies sich als signifikant ($p = 0,003$) (vgl. Abbildung 18B).

p21 wurde dagegen in beiden Altersgruppen nahezu gleich stark exprimiert (1,07 (0,82-1,20) vs. 1,14 (1,09-1,17), $p = 0,072$) (s. Abbildung 18C). Bei der Genexpression von p53 zeigte sich eine leichte Hochregulation im Alter (1,02 (0,32) vs. 1,27 (1,27-1,42)). Der Unterschied erwies sich nicht als signifikant ($p = 0,449$) (s. Abbildung 18D).

6.3.2 Auswirkung der mikroglialen Depletion

Durch die zweiwöchige Behandlung mit dem spezifischen CSF1R-Inhibitor PLX5622 erfolgte eine Depletion von etwa 84 % der Mikroglia in der Retina. Mikroglia exprimieren im aktivierten Zustand eine Reihe von proinflammatorischen Zytokinen. Sie interagieren mit den anderen Zelltypen der Retina wie den Neuronen und Müller-Zellen. Diese Interaktionen fallen durch die Depletion der Mikroglia weg. Die RNA der Retinae von jungen und alten depletierten Mäusen wurden untereinander sowie mit den jeweiligen Kontrolltieren verglichen, um eine potenzielle Auswirkung auf die Genexpression des depletierten Gewebes zu untersuchen.

6.3.2.1 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Für die Genexpression von IL-1 β ließen sich keine signifikanten Unterschiede weder zwischen der jungen und alten Depletionsgruppe noch zwischen den Depletionsgruppen zu den Kontrollgruppen nachweisen ($p = 0,128$). Die junge und alte Depletionsgruppe wiesen eine ähnliche Expressionsrate auf (1,85 (0,27) vs. 1,80 (0,44)). Die junge Depletionsgruppe zeigte dabei eine leichte Hochregulation im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe (0,97 (0,89-1,08)). Die Expressionsrate der alten Depletionsgruppe glich der der alten Kontrollgruppe (1,79 (1,60-2,40)) (vgl. Abbildung 17A).

Auch in der Genexpression von TNF- α zeigten sich weder signifikante Unterschiede innerhalb der Depletionsgruppen ($p = 0,213$) noch verglichen zu den Kontrollgruppen ($p = 1,0$). Die junge Depletionsgruppe zeigte eine leichte Runterregulation von TNF- α (0,76 (0,09)) verglichen mit der jungen Kontrollgruppe (1,06 (0,43)) sowie mit der alten Depletionsgruppe (1,75 (1,44)). Auch die alte Depletionsgruppe wies eine

geringere Expressionsrate von TNF- α auf als die alte Kontrollgruppe (1,75 (1,44) vs. 2,61 (2,32-2,74)) (vgl. Abbildung 17B).

In der Genexpression von IL-6 gab es keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Depletionsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen. Die junge und alte Depletionsgruppen wiesen eine fast identische Expressionsrate auf (1,12 (0,15) vs. 1,11 (1,08-1,20), $p = 0,184$) (vgl. Abbildung 17C).

6.3.2.2 Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

Die Genexpression von IL-10 zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Depletionsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen ($p = 0,312$). Während die alte Depletionsgruppe eine leicht erhöhte Expressionsrate (1,13 (0,16)) im Vergleich zur alten Kontrollgruppe (1,03 (0,98-1,08)) aufwies, war die Genexpression der jungen Depletionsgruppe (1,01 (0,09)) fast identisch mit der jungen Kontrollgruppe (1,01 (0,13)) (vgl. Abbildung 17D).

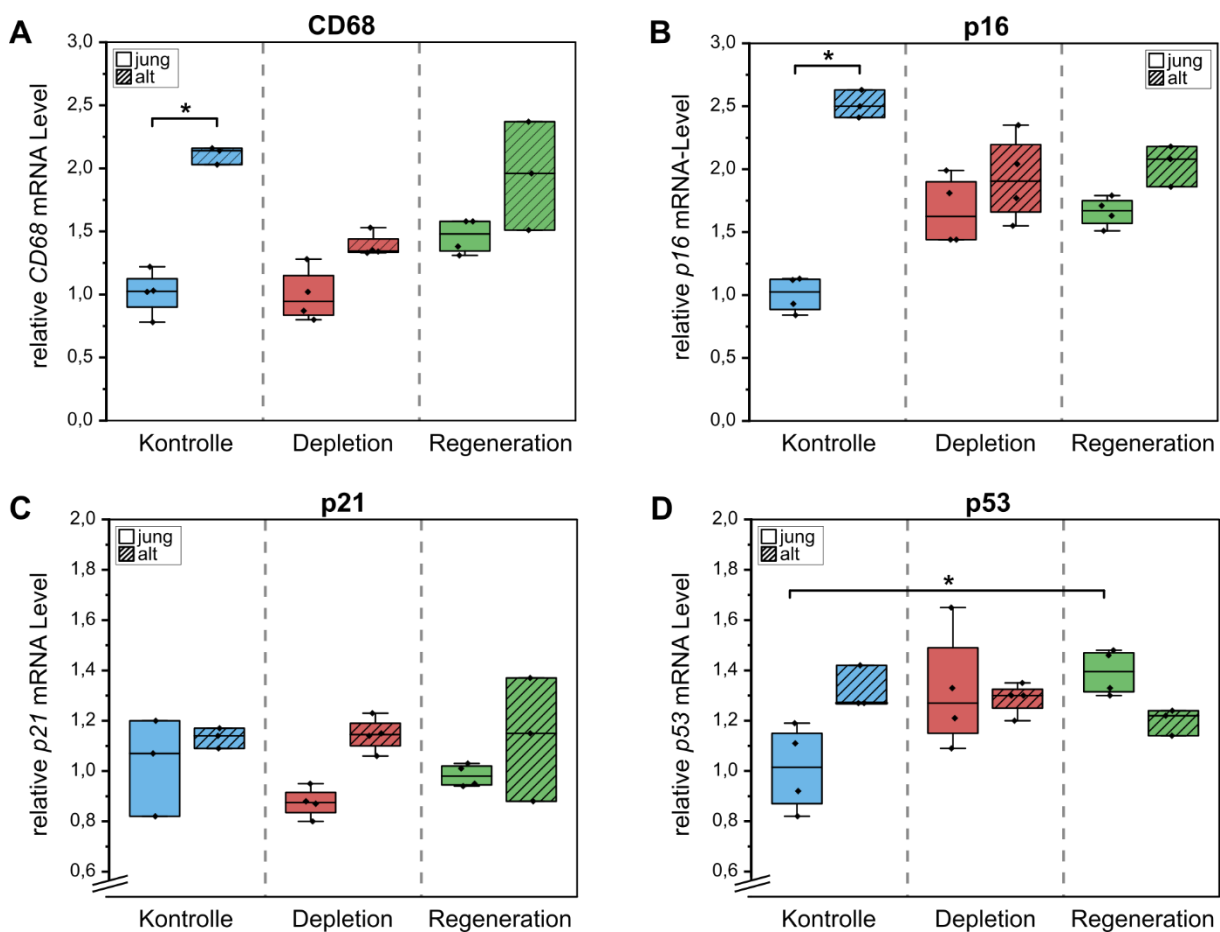


Abbildung 18: Relative Expressionsraten der analysierten Gene: Phagozytosemarker CD68 (A), Seneszenzmarker (B-D). Kruskal-Wallis-Test mit Post-hoc-Test über Mehrfachvergleiche mit Bonferroni-Korrektur. Das Signifikanzniveau beträgt $\alpha = 0,05$.

6.3.2.3 Expression des Phagozytosemarkers CD68

Für die Genexpression von CD68 ließen sich keine signifikanten Unterschiede weder innerhalb der Depletionsgruppen noch mit ihrer entsprechenden Kontrollgruppe zeigen ($p = 1,0$). Die Expressionsrate der jungen Depletionsgruppe glich mit 0,95 (0,40) der jungen Kontrollgruppe (1,03 (0,33)). Die alte Depletionsgruppe zeigte eine etwas höhere Expressionsrate als die junge Depletionsgruppe (1,35 (0,15) vs. 0,95 (0,40)) und eine verminderte Expressionsrate als die alte Kontrollgruppe (1,35 (0,15) vs. 2,14 (2,03-2,16)) (vgl. Abbildung 18A).

6.3.2.4 Expression der Seneszenzmarker p16, p21 und p53

Die junge und alte Depletionsgruppe zeigten ähnliche Werte in der Genexpression von p16 (1,63 (0,51) vs. 1,91 (0,67)). Die junge Depletionsgruppe zeigte eine leichte Hochregulation verglichen zur jungen Kontrollgruppe (1,63 (0,51) vs. 1,03 (0,26)) und die alte Depletionsgruppe eine Runterregulation zur alten Kontrollgruppe (1,91 (0,67) vs. 2,50 (2,41-2,63)). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 1,0$) (vgl. Abbildung 18B).

Für die Genexpression von p21 zeigte die junge Depletionsgruppe eine verringerte Expressionsrate verglichen zur jungen Kontrollgruppe (0,88 (0,12) vs. 1,07 (0,82-1,20)) und zur alten Depletionsgruppe (1,15 (0,13)). Die alte Depletionsgruppe wies eine nahezu identische Expressionsrate mit der alten Kontrollgruppe auf (1,14 (1,09-1,17)). Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ($p = 0,072$) (vgl. Abbildung 18C).

Auch in der Genexpression von p53 wies die alte Depletionsgruppe eine nahezu identische Expressionsrate auf wie die alte Kontrollgruppe (1,3 (0,11) vs. 1,27 (1,27-1,42), $p = 1,0$) und die junge Depletionsgruppe (1,27 (0,45), $p = 1,0$). Die junge Depletionsgruppe zeigte verglichen mit der jungen Kontrollgruppe eine geringe Hochregulation (1,27 (0,45) vs. 1,02 (0,32), $p = 0,689$) (vgl. Abbildung 18D).

Bei allen drei Seneszenzmarkern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Depletionsgruppen sowie zu den Kontrollgruppen.

6.3.3 Auswirkung der Regeneration der Mikroglia population

Nach Absetzen des spezifischen CSF1R-Inhibitors PLX5622 erfolgte eine vollständige Regeneration der Mikroglia population in der Retina sowohl in jungen wie in alten Mäusen. Um eine mögliche Auswirkung der regenerierten Mikroglia auf das Gewebe

zu untersuchen, wurde die RNA von jungen und alten regenerierten Mäusen sowohl untereinander als auch mit den anderen Behandlungsgruppen verglichen.

6.3.3.1 Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α

In der Genexpression von IL-1 β zeigte sich eine geringe Hochregulation in der jungen Regenerationsgruppe im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe (2,13 (0,50) vs. 0,97 (0,89-1,08)) ebenso wie in der alten Regenerationsgruppe im Vergleich zur alten Kontrollgruppe (2,59 (1,54-3,63) vs. 1,79 (1,60-2,40)). Die alte Regenerationsgruppe zeigte eine leicht erhöhte Expressionsrate im Vergleich zur jungen Regenerationsgruppe. Signifikant waren die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch nicht ($p = 0,128$) (vgl. Abbildung 17A).

In der Genexpression von TNF- α zeigte die alte Regenerationsgruppe zwar eine geringe Hochregulation verglichen mit der jungen Regenerationsgruppe (2,23 (1,85-2,60) vs. 1,58 (1,04)), aber eine Runterregulation verglichen mit der alten Kontrollgruppe (2,61 (2,32-2,74)). Die junge Regenerationsgruppe zeigte eine geringe Hochregulation verglichen mit der jungen Kontrollgruppe (1,58 (1,04) vs. 1,06 (0,43)). Signifikant waren die Unterschiede zwischen den Gruppen jedoch nicht ($p = 1,0$) (vgl. Abbildung 17B).

In der Genexpression von IL-6 entsprachen beide Regenerationsgruppen den Werten ihrer entsprechenden Kontrollgruppe. Die junge Regenerationsgruppe wies eine Expressionsrate von 0,99 (0,22), die alte Regenerationsgruppe von 1,15 (1,01-1,20) auf. Zum Vergleich wies die junge Kontrollgruppe eine Expressionsrate von 1,03 (0,13), die alte Kontrollgruppe von 1,14 (1,08-1,17) auf. Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen ($p = 0,184$) (vgl. Abbildung 17C).

6.3.3.2 Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10

Die Genexpression von IL-10 war in beiden Regenerationsgruppen nahezu identisch und wies keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen auf ($p = 0,312$). Die junge Regenerationsgruppe wies eine Expressionsrate von 0,99 (0,15) auf, die alte Regenerationsgruppe von 0,98 (0,96-1,08). Zum Vergleich wies die junge Kontrollgruppe eine Expressionsrate von 1,01 (0,13) auf, die alte Kontrollgruppe von 1,03 (0,98-1,08) (vgl. Abbildung 17D).

6.3.3.3 Expression des Phagozytosemarkers CD68

Die alte Regenerationsgruppe zeigte eine geringe Hochregulation der Expressionsrate von CD68 im Vergleich zur jungen Regenerationsgruppe (1,96 (1,51-2,37) vs. 1,48 (0,25), $p = 1,0$) aber eine verminderte Expression im Vergleich zur alten Kontrollgruppe (2,14 (2,03-2,16), $p = 1,0$). Die junge Regenerationsgruppe zeigte eine geringe Hochregulation von CD68 im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe (1,48 (0,25) vs. 1,03 (0,33), ($p = 0,701$)). Die Genexpression von CD68 wies keine signifikanten Unterschiede innerhalb der Regenerationsgruppen noch zu den Kontrollgruppen auf (vgl. Abbildung 18A).

6.3.3.4 Expression der Seneszenzmarker p16, p21 und p53

Die alte Regenerationsgruppe exprimierte mit einer Rate von 2,08 (1,86-2,18) etwas mehr p16 als die junge Regenerationsgruppe (1,67 (0,23)), aber weniger als die alte Kontrollgruppe (2,50 (2,41-2,63)). Auch die junge Regenerationsgruppe zeigte eine geringe Hochregulation von p16 im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe (1,67 (0,23) vs. 1,03 (0,26)). Signifikant waren die Unterschiede jedoch nicht ($p = 1,0$) (vgl. Abbildung 18B).

Die Genexpression von p21 war dagegen in beiden Regenerationsgruppen nahezu identisch und wies keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen auf ($p = 0,072$). Die junge Regenerationsgruppe wies eine Expressionsrate von 0,98 (0,08) auf, die alte Regenerationsgruppe von 1,15 (0,88-1,37). Zum Vergleich wies die junge Kontrollgruppe eine Expressionsrate von 1,07 (0,82-1,20) auf, die alte Kontrollgruppe von 1,14 (1,09-1,17) (vgl. Abbildung 18C).

In der Genexpression von p53 ließ sich dagegen ein signifikanter Unterschied zwischen der jungen Kontrollgruppe und der jungen Regenerationsgruppe nachweisen ($p = 0,021$). Die junge Regenerationsgruppe wies eine 1,4-fache Hochregulation der Genexpression von p53 im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe auf (1,40 (0,17) vs. 1,02 (0,32)). Die alte Regenerationsgruppe wies eine ähnliche Expression wie die alte Kontrollgruppe (1,22 (1,14-1,24) vs. 1,27 (1,27-1,42), $p = 1,0$) und eine etwas verringerte Expression als die junge Regenerationsgruppe auf ($p = 0,691$) (vgl. Abbildung 18D).

7 Diskussion

7.1 Vergleich der Anzahl und Verteilung der retinalen Mikroglia im Alter und bei mikroglialer Depletion und Regeneration

Studien zeigen auf, dass es mit steigendem Alter zu Veränderungen in der Anzahl und Verteilung der retinalen Mikroglia kommt (Damani et al. 2011, Hefendehl et al. 2014). Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte in dieser Arbeit eine Analyse alterungsabhängiger Veränderungen. Weiterhin wurde untersucht, ob und in welcher Weise eine pharmakologische Depletion und Regeneration durch PLX5622 Einfluss auf die Anzahl und die Verteilung der Mikroglia über die Retinaschichten nimmt.

7.1.1 Auswertung der verwendeten Retinaschnitte

Für die Bestimmung der Anzahl der retinalen Mikroglia wurden Querschnitte der Retina von 16 µm Dicke verwendet. Aufgrund der Vielzahl an Schnitten pro Retina wurde nur ein kleiner repräsentativer Anteil der Schnitte untersucht und die Werte von vier Schnitten pro Retina auf die Gesamtretna hochgerechnet. Dadurch kann es durch die Wahl der Schnitte zu Abweichungen der Realität kommen. Eine andere Option ist die Untersuchung von retinalen Kompletpräparaten, sogenannten *retinal whole-mounts*. Dabei handelt es sich um die Fixierung der flach ausgebreiteten Retina. Retinale Kompletpräparate bilden die gesamte Retina ab, sodass eine direkte Bestimmung der Gesamtzellzahl möglich ist. Allerdings ist eine Unterscheidung zwischen den Retinaschichten schwer durchführbar. Da für die vorliegende Arbeit von Bedeutung war, ob sich die Verteilung der Zellzahlen in den Retinaschichten im Alter sowie durch mikrogliale Depletion und Regeneration verändert, war die Verwendung von Querschnitten besser geeignet.

Das Protein *ionized calcium-binding adaptor molecule 1* (Iba1) ist ein Makrophagen/Mikroglia-spezifisches calciumbindendes Protein, welches im Prozess der Membranausstülpung bei Phagozytose involviert ist (Imai et al. 1996, Kanazawa et al. 2002). Im Gehirn wird es spezifisch von Mikroglia exprimiert und findet sich weder in Neuronen, Astrozyten noch in Oligodendrozyten. Innerhalb der Mikroglia wird Iba1 übergreifend von verschiedenen Funktionszuständen oder Subpopulationen über das gesamte Gehirn exprimiert (Imai und Kohsaka 2002). Da Iba1 insbesondere bei mikroglialer Aktivierung hochreguliert wird (Ito et al. 1998), eignete es sich in dieser

Arbeit sehr gut zur Darstellung und weiteren morphologischen Analyse der Mikroglia aller Funktionszustände.

7.1.2 Alterungsabhängige Veränderungen der Mikroglia

Mikroglia konnten, wie zuvor beschrieben (Wang 2016, Hilla 2017), vor allem in den plexiformen Schichten der IPL und OPL, aber in geringerem Maße auch in den anderen Schichten der Retina detektiert werden. Damani *et al.* beschrieben eine erhöhte Anzahl an Mikroglia in alten Retinae (Damani et al. 2011). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe wiesen die Retinae der alten Kontrollgruppe 42 % mehr Mikroglia auf. Aufgrund der geringen Stichprobengröße erwies sich der Unterschied jedoch nicht als statistisch signifikant. Die Verteilung der Mikroglia über die retinalen Schichten zeigte keinen signifikanten alterungsabhängigen Unterschied. Dennoch deutete sich eine Anteilsverschiebung in Richtung der äußeren Retinaschichten im Alter an. Auch in der Literatur wird ein Anstieg der Zelldichte in der OPL und im subretinalen Bereich beschrieben (Damani et al. 2011, Ma et al. 2013). Darüber hinaus zeigten Tremblay *et al.* im Gehirn, dass die Verteilung der Mikroglia im Parenchym unregelmäßiger wird und es zu einer Verringerung der Distanz zwischen benachbarter Mikroglia kommt (Tremblay et al. 2012). Im Gegensatz zu jungen Zellen liegen die alten Zellkörper häufig als Cluster nahe beieinander, teilweise nur 20 µm voneinander entfernt (Tremblay et al. 2012, Hefendehl et al. 2014). Der Anstieg der Zellzahl könnte deshalb ein Zeichen für anhaltende Proliferation oder ein Verlust der Erhaltung des Zellterritoriums im Alter sein (Tremblay et al. 2012).

7.1.3 Einfluss von CSF1R-Inhibitor PLX5622 auf die Mikroglia im Alter

In Mausgehirnen und jungen Mausretinae konnte die Wirkung und Effizienz des CSF1R-Inhibitors PLX5622 bereits nachgewiesen werden (Dagher et al. 2015, Hilla et al. 2017, Elmore et al. 2018, Kokona et al. 2018). Mit dieser Arbeit konnte erstmalig auch die Wirkung in alten Mausretinae gezeigt werden. Dabei zeigte sich, dass die Effizienz einer zweiwöchigen Depletion keinen alterungsabhängigen Unterschied aufweist. Sowohl in jungen wie auch alten Mäusen konnten 84 % der retinalen Mikroglia entfernt werden. Die Effizienz fiel damit geringer aus als in anderen Studien, bei denen eine vollständige Depletion in jungen Retinae erreicht werden konnte (Huang et al. 2018a). Während Elmore *et al.* eine verringerte Wirkung von PLX5622 in

alten Gehirnen auffanden (Elmore et al. 2018), scheint dies in der Retina nicht der Fall zu sein. Darüber hinaus deutete sich in den alten Retinae eine stärkere Wirkung der Depletion in den äußeren Retinaschichten an. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl wies der Unterschied jedoch keine statistische Signifikanz auf.

Die Gründe warum in dieser, wie auch in anderen Studien, einige Zellen nicht durch PLX5622 depletiert wurden, bleiben offen (Zhang et al. 2018). Es könnte sich um einen lokalen Überlebensdruck handeln, welcher den Einfluss der zellulären Depletion bei sinkenden Zellzahlen überwindet und nach Absetzen von PLX5622 zur lokalen Proliferation der überlebenden Zellen führt (Zhang et al. 2018). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass es sich um eine andere Subpopulation von Mikroglia handelt. Hammond *et al.* konnten neun verschiedene Subpopulationen von Mikroglia mit einem eigenen Genexpressions- und Ortsprofil unterscheiden (Hammond et al. 2019). Es ist möglich, dass es sich bei den nicht depletierten Mikroglia um einen bestimmten Subtyp handelt, der durch eine verminderte Genexpression von CSF1R eine Resistenz gegenüber dem CSF1R-Inhibitor aufweist (Paschalis et al. 2018).

Eine Regeneration der Mikroglia durch die Proliferation dieses Subtyps könnte bedeuten, dass eine erneute Depletion mit PLX5622 weniger Mikroglia entfernen würde. Studien mit mehrfach durchgeführter Depletion unter physiologischen Bedingungen widerlegen dies aber (Najafi et al. 2018, Paschalis et al. 2018).

7.1.4 Charakterisierung der mikroglialen Regeneration

Das Absetzen des CSF1R-Inhibitors nach einer einwöchigen Gabe stimulierte die Repopulation der Retina mit neuen Mikroglia in jungen und alten Mäusen. In beiden Altersgruppen trat eine erhöhte Zellzahl auf (vgl. Abbildung 10). Die jungen Mäuse wiesen 39 %, die alten Mäuse 20 % mehr Zellen auf als ihre altersentsprechende Kontrollgruppe. Diese Überschreitung der basalen Zellzahl wurde in der Retina bisher nicht gezeigt (Huang et al. 2018a, Zhang et al. 2018). Im Gehirn dagegen konnte eine Überschreitung der basalen Zellzahl bereits sieben Tage nach Absetzen von PLX5622 gezeigt werden, welche sich nach 21 Tagen auf die Basalwerte der Kontrollgruppen zurückbildete (Elmore et al. 2018). Die Proliferation und Regeneration der Mikroglia scheint in der Retina langsamer stattzufinden als im Gehirn. In einer neueren Studie wiesen Zhan *et al.* jedoch auch im Gehirn nach, dass die Regeneration der Mikrogliapopulation bis zu zwei Monate benötigt (Zhan et al. 2019). In zukünftigen

Studien sollte die Bestimmung der Zellzahl nach Absetzen von PLX5622 um weitere Zeitpunkte ergänzt werden.

Die Verteilung der Mikroglia über die retinalen Schichten entsprach derjenigen der Kontrollgruppen. Die Veränderungen in den Depletionsgruppen waren in den Regenerationsgruppen nicht mehr nachweisbar. Die Regeneration der Mikroglia bewirkte eine Wiederherstellung des ursprünglichen Verteilungsmuster mit einer proportionalen Zellzahlerhöhung in allen Retinaschichten (vgl. Abbildung 10). Zhang *et al.* zeigten in ihrer Arbeit, dass die mikrogliale Proliferation und Migration in der Retina synchron verlaufen. Durch eine rasche Proliferation wird eine überhöhte Anzahl an Mikroglia in der IPL gebildet, die anschließend in die anderen Schichten migrieren, um die ursprüngliche Verteilung zu erreichen (Zhang *et al.* 2018). Diese Ergebnisse finden sich auch in der vorliegenden Beobachtung, dass Mikroglia nach pharmakologischer Depletion vor allem in der IPL zurückbleiben, sodass insbesondere von dort eine Proliferation und Migration stattfinden kann. Mehrere Studien konnten darlegen, dass die mikrogliale Regeneration mittels einer lokalen Selbsterneuerung durch die Proliferation nicht depletierter Mikroglia stattfindet (Bruttger *et al.* 2015, Huang *et al.* 2018b, Zhang *et al.* 2018). Allerdings weisen Studien mit einer vollständigen Depletion darauf hin, dass es unterschiedliche Ursprünge der mikroglialen Regeneration gibt. In der Retina migrieren zum einen residuale Mikroglia aus dem optischen Nerv in die Zentralregion, zum anderen über die Iris und den Ziliarkörper in die Peripherie der Retina ein (Huang *et al.* 2018a). Um Hinweise über einen möglichen unterschiedlichen Ursprung zu bekommen, erfolgte in dieser Arbeit eine morphologische Analyse der Mikroglia.

7.2 Morphologische Analyse der jungen und alten retinalen Mikroglia

Zur Untersuchung der Morphologie wurden verschiedene Parameter genutzt, die zum einen die Größe und die Einnahme eines territorialen Raumes betrachten, zum anderen aber auch die Komplexität der Zellfortsätze berücksichtigen. Dies erlaubte die Untersuchung, ob sich Mikroglia bereits bei grober Betrachtung oder nur im Detail unterscheiden. Die Sholl-Analyse wurde ursprünglich zur morphologischen Analyse von Neuronen entwickelt (Sholl 1953). Da sie Informationen über die Anzahl und Anordnung der Verzweigungen in einer bestimmten Distanz vom Zellkörper angibt

(Catalin et al. 2013) und bereits bei Mikroglia Anwendung findet (Morrison und Filosa 2013, Yamada und Jinno 2013, Yang et al. 2018), wurde sie auch in dieser Arbeit verwendet. Für die Betrachtung des zellulären Territoriums erfolgte die Bestimmung der Fläche und des Volumens mithilfe einer komplexen Hülle (s. Abbildung 7) (Fontainhas et al. 2011, Singaravelu et al. 2017, Cengiz et al. 2019). Basierend auf weiteren Veröffentlichungen wurden zusätzliche Parameter wie die Gesamtfortsatzlänge, die Anzahl der Fortsatzsegmente und -Endpunkte bestimmt sowie der maximale Verzweigungsgrad und die maximale Ordnung der Fortsätze pro Zelle ermittelt (zur Veranschaulichung s. Abbildung 6B) (Fontainhas et al. 2011, Davies et al. 2017, Cengiz et al. 2019).

7.2.1 Alterungsabhängige morphologische Unterschiede der Mikroglia ohne Vorhandensein dystropher Zellen

Neben veränderter Funktionalität besitzen Mikroglia im Alter eine veränderte Morphologie mit Verlust ihrer fein verzweigten Zellfortsätze (Deramifizierung). Alte Mikroglia weisen zudem eine verminderte Fortsatzlänge auf, einhergehend mit einer Abnahme der Spannweite, der territorialen Fläche und des Volumens (Damani et al. 2011, Tremblay et al. 2012, Hefendehl et al. 2014, Davies et al. 2017). Zudem zeigen sie im Alter variablere Zellkörper (Tremblay et al. 2012). Der Zellkörper ist hypertrophiert und der Nucleus füllt fast das komplette Soma aus (Sheng et al. 1998, Conde und Streit 2006, Hefendehl et al. 2014), sodass gewisse morphologische Ähnlichkeiten zur reaktiven Form bestehen. Allerdings bestehen deutliche Unterschiede in der funktionellen Dynamik der Mikroglia. Die Fortsatzmotilität nimmt im Alter ab, während die Motilität der Zellsomata zunimmt (Damani et al. 2011, Hefendehl et al. 2014).

In dieser Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Mikroglia von jungen und alten Mäusen, weder in der Zentralregion noch in der Peripherie aufgezeigt werden (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 14). Alle untersuchten Parameter fielen in der jungen und alten Kontrollgruppe ähnlich aus. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Regionen innerhalb derselben Altersgruppe. Mikroglia der Zentralregion wiesen in der jungen wie in der alten Kontrollgruppe ähnliche Werte auf wie solche der Peripherie. Auch andere Studien zeigten, dass insbesondere in der Komplexität der Verzweigungsmuster der Zellfortsätze keine Unterschiede zwischen jungen und alten Mikroglia bestehen (Hefendehl et al. 2014).

Weiterhin können Gründe für das Fehlen von Unterschieden in der verwendeten Methodik liegen. Zum einen wurde bei der Analyse der Zellen nicht zwischen den Schichten unterschieden. Mikroglia in der IPL können jedoch andere morphologische Merkmale aufweisen als solche in der OPL (Diaz-Araya et al. 1995). Viele der Studien, die Unterschiede zwischen jungen und alten Mikroglia aufwiesen, basierten auf *in vivo live-imaging*-Techniken. In dieser Arbeit wurde die Morphologie der Mikroglia dagegen anhand von fixierten retinalen Querschnitten ausgewertet. In folgenden Studien könnten Mikroglia zusätzlich innerhalb der jeweiligen Schichten ausgewertet werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, die mikrogliale Morphologie anhand von retinalen Kompletpräparaten oder direkt mithilfe von *in vivo live cell imaging* zu untersuchen. Durch die Narkose der Tiere ist eine Veränderung des mikroglialen Funktionszustandes allerdings nicht auszuschließen und eine Unterscheidung der Retinaschichten bei retinalen Kompletpräparaten schwer durchführbar.

Streit et al. stellten fest, dass der Anteil an dystrophen Mikroglia mit steigendem Alter zunimmt (Streit et al. 2004). Auch andere Arbeitsgruppen konnten derartige Veränderungen nachweisen (Lopes et al. 2008, Rodriguez-Callejas et al. 2016, Safaiyan et al. 2016). Dystrophe Zellen sind durch verkürzte und verdrehte Zellfortsätze, Fragmentierungen des Zellkörpers und durch Anreicherung von lysosomalen Einschlusskörperchen mit Zellresten und Proteinaggregaten gekennzeichnet (Peters et al. 1991, Streit et al. 2004, Tremblay et al. 2012). Insbesondere die phagozytotische Überladung mit Proteinaggregaten scheint zu einem mangelnden Abbau dieser Aggregate und damit einhergehender Degeneration der Mikroglia zu führen (Lopes et al. 2008, Neumann et al. 2009, Rodriguez-Callejas et al. 2016, Safaiyan et al. 2016). In dieser Arbeit konnten keinerlei signifikante morphologische Unterschiede zwischen jungen und alten Mikroglia aufgezeigt werden, sodass keine Hinweise auf dystrophe Mikroglia in alten Retinae bestehen. Es ist möglich, dass die dystrophen Zellen einen zu geringen Anteil an allen untersuchten Mikroglia ausmachten und somit keinen relevanten Einfluss hatten. Andererseits traten die in der Literatur beschriebenen dystrophen Zellen besonders im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer-Krankheit auf (Streit et al. 2004, Davies et al. 2017, Streit et al. 2020). In dieser Arbeit erfolgte jedoch eine Untersuchung der Mikroglia im physiologischen und gesunden Zustand.

7.2.2 Charakterisierung der nicht depletierten Mikroglia

Studien am ZNS und an der Retina deuten darauf hin, dass der Großteil der Mikroglia bereits eine Woche nach Behandlung mit PLX5622 entfernt wird, die Depletion aber noch unvollständig ist (Ebner et al. 2017, Hilla et al. 2017, Elmore et al. 2018). Um eine vollständige Depletion zu erreichen, die Mikroglia möglichst effizient zu entfernen und die Auswirkungen auf das Mikroglia-arme Gewebe zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Behandlung von 14 Tagen festgelegt.

In den jungen wie in den alten Retinae verblieben trotz zweiwöchiger Gabe von PLX5622 16 % der Mikroglia, weshalb eine morphologische Betrachtung dieser Zellen möglich war. Weder in der Zentralregion noch in der Peripherie gab es einen signifikanten alterungsabhängigen Unterschied zwischen den beiden Depletionsgruppen. Die Mikroglia der jungen Depletionsgruppe zeigten in der Zentralregion eine Tendenz zu höheren Werten in der Gesamtfortsatzlänge, der territorialen Fläche und dem Volumen. Signifikante Unterschiede gab es dabei nicht. Es zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen den Regionen innerhalb derselben Altersgruppe. In der jungen Depletionsgruppe wiesen Mikroglia der Zentralregion einen geringeren maximalen Verzweigungsgrad auf als solche in der Peripherie (s. Abbildung 15). In allen anderen Parametern war kein signifikanter Unterschied vorhanden. Ebenso zeigte sich im regionsgetrennten Vergleich der Behandlungsgruppen bis auf den maximalen Verzweigungsgrad kein signifikanter Unterschied zwischen den Mikroglia der Depletions- und der Kontrollgruppen (vgl. Abbildung 11 und Abbildung 14). Dennoch lässt sich sagen, dass sich die nicht depletierten Zellen morphologisch nicht von den Kontrollzellen unterscheiden. Sollte es sich bei den nicht depletierten Zellen um einen anderen Subtyp handeln, der einer Wirkung von PLX5622 entgeht, scheint er die gleichen morphologischen Eigenschaften zu besitzen wie die Kontrollzellen. Es bleibt zu beweisen, ob sich die nicht depletierten Mikroglia in ihrer Funktionsweise oder der genetischen Expression von Kontrollzellen unterscheiden.

Zudem muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den in dieser Arbeit betrachteten Zellen nur um eine geringe Stichprobe handelte. Um aussagekräftigere Antworten zu erhalten ist eine Studie mit einer größeren Stichprobe an Versuchstieren nötig.

7.2.3 Charakterisierung der regenerierten Mikroglia

Die Untersuchung der mikroglialen Regeneration fand 21 Tage nach Absetzen des CSF1R-Inhibitors statt, um eine möglichst vollständige mikrogliale Regeneration zu ermöglichen. Studien zeigten, dass Mikroglia bereits wenige Tage nach Absetzen des CSF1R-Inhibitors anfangen zu regenerieren (Dagher et al. 2015, Elmore et al. 2018, Zhang et al. 2018). Erst nach etwa 21 Tagen erreichen Dichte und Zellzahl der Mikroglia ihre ursprünglichen Werte (Elmore et al. 2014, Huang et al. 2018a). Ähnlich wie im Gehirn interagieren retinale Mikroglia mit einer Vielzahl von Zelltypen. Durch einen Austausch mit Müller-Zellen bewirken sie beispielsweise die Freisetzung neurotropher Faktoren, welche das Überleben der Photorezeptoren unterstützen (Karlstetter et al. 2015). Zwar wurde in Studien beschrieben, dass die retinale Struktur, das Überleben von retinalen Neuronen sowie die Organisation von neuronal-dendritisch und axonalen Kompartimenten unter einer mikroglialen Depletion von bis zu einem Monat unbeeinflusst bleiben (Wang et al. 2016, Hilla et al. 2017). Wang et al. legten aber dar, dass eine langanhaltende mikrogliale Depletion in der Retina eine Degeneration von Synapsen der Photorezeptoren und folglich eine Abnahme der Antwortstärke auf Lichtreize bewirkt (Wang et al. 2016). Die genauen Auswirkungen der mikroglialen Depletion auf die anderen retinalen Zelltypen durch fehlende Zell-Zell-Kommunikation bleiben zu zeigen. Da der Großteil der Mikroglia bereits nach einer einwöchigen Behandlung mit PLX5622 depletiert ist (Huang et al. 2018a), wurde die Regenerationsgruppe nur für diesen Zeitraum behandelt, um die Gesamtfunktion der Retina nicht zu beeinträchtigen. Um mögliche morphologische Unterschiede oder Ähnlichkeiten festzustellen, wurden die Regenerations- und Depletionsgruppen verglichen. Sollte der Anteil an nicht depletierten Mikroglia der Depletionsgruppe eine Art „Vorläufer-Pool“ darstellen, aus denen sich Mikroglia durch klonale Proliferation regenerieren, könnten die regenerierten Zellen diesem Subtyp ähneln. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass sich die regenerierten Zellen der Mikroumgebung anpassen und eventuell sogar die ursprüngliche Morphologie wieder aufnehmen.

Weder in der Zentralregion noch in der Peripherie gab es einen signifikanten alterungsabhängigen morphologischen Unterschied zwischen den beiden Regenerationsgruppen (vgl. Abbildung 11, Abbildung 14). Zusätzlich ließen sich die regenerierten Mikroglia anhand der gewählten morphologischen Parameter nicht von den Mikroglia der Kontrollgruppen und Depletionsgruppen unterscheiden. Da sich

bereits die beiden Kontrollgruppen morphologisch nicht unterscheiden, kann anhand der gewählten Parameter keine Aussage getroffen werden, ob die regenerierten Mikroglia eine Verjüngung alter Mikroglia darstellen. Dazu werden weitere Untersuchungen zum Funktionszustand und der genetischen Expression benötigt. Eine weitere Erklärung besteht darin, dass sich die regenerierten Mikroglia bereits wieder der Mikroumgebung der Retina angepasst haben und dadurch keine morphologischen Unterschiede aufweisen.

Ähnlich der Debatte über den Ursprung der Mikroglia gibt es eine Debatte über den Ursprung der regenerierten Mikroglia. Die Möglichkeit, dass PLX5622 keine mikrogliale Depletion, sondern nur eine Dedifferenzierung der Zellen mit Verlust mikroglialer Marker wie Iba1 darstellt, konnten Huang *et al.* widerlegen (Huang *et al.* 2018b). Die regenerierten Mikroglia stellen keine redifferenzierten Zellen nach Absetzen des Inhibitors, sondern neu gebildete Zellen dar.

Weitere Studien zeigten, dass regenerierte Mikroglia kurze Zeit nach Beendigung der mikroglialen Depletion vorübergehend Nestin exprimieren (Elmore *et al.* 2014, Bruttger *et al.* 2015, Zhan *et al.* 2019). Dabei scheint Nestin allerdings nur ein transienter Marker der frisch regenerierten Zellen, induziert von der Mikroumgebung des ZNS, und kein Marker für einen möglichen Vorläuferzelltyp zu sein (Bruttger *et al.* 2015, Huang *et al.* 2018b, Zhan *et al.* 2019). Elmore *et al.* wiesen eine Proliferation von nicht-mikroglialen Zellen nach Absetzen der mikroglialen Depletion nach, welche einen nicht-mikroglialen Vorläuferzelltyp darstellen könnten (Elmore *et al.* 2014). Ein bisher unbekannter Vorläuferzelltyp konnte bisher jedoch nicht nachgewiesen werden (Huang *et al.* 2018b, Zhan *et al.* 2019). Zusätzlich konnte ausgeschlossen werden, dass die regenerierten Mikroglia von Astrozyten, Neuronen oder Vorläuferzellen für Oligodendrozyten stammen (Huang *et al.* 2018b, Zhan *et al.* 2019).

Myeloische Zellen wie Makrophagen dagegen besitzen die Fähigkeit, die mikrogliale Nische im ZNS aufzufüllen (Varvel *et al.* 2012, Lund *et al.* 2018). Diese myeloischen Zellen übernehmen zwar viele der Funktionen der Mikroglia, sind jedoch nicht mit diesen identisch. So unterscheiden sie sich unter anderem in ihrer Anzahl, Morphologie, Funktion und Genexpression (Kaneko *et al.* 2008, Varvel *et al.* 2012, Bruttger *et al.* 2015, Lund *et al.* 2018). Cronk *et al.* legten dar, dass eingewanderte Makrophagen einen eigenen Zelltyp darstellen und eine eigene funktionelle und transkriptionelle Identität aufweisen (Cronk *et al.* 2018). Zhan *et al.* dagegen zeigten,

dass myeloische Zellen zwar ins ZNS einwandern und zu Mikroglia-ähnlichen Zellen werden, jedoch nur einen geringen Anteil der regenerierten Mikroglia ausmachen (Zhan et al. 2019). Unter physiologischen Bedingungen scheint die lokale Selbsterneuerung ausreichend zu sein, um eine mikrogliale Repopulation des gesamten ZNS-Parenchyms zu bewirken (Bruttger et al. 2015, Huang et al. 2018b, Zhan et al. 2019). Dabei reicht ein minimaler Anteil von $< 1\%$ der Mikrogliapopulation aus (Huang et al. 2018b). Mehrere stabile Ansammlungen klonaler Zellproliferationen werden gebildet, von welchen aus Mikroglia in das umliegende Parenchym migrieren (Bruttger et al. 2015, Zhan et al. 2019). Interessanterweise ähneln die neu gebildeten Mikroglia in den ersten vier Tagen neonatalen Mikroglia in bis zu 34 % des Genprofils. Mit der Zeit nehmen die Ähnlichkeiten ab und diese Mikroglia erlangen das Profil reifer, adulter Mikroglia (Zhan et al. 2019). Die Wiederherstellung der Zellreife geht mit einer Hochregulation von Zell-Zyklus-Prozessen, Mitose und Apoptose einher (Askew et al. 2017, Zhan et al. 2019). Der Reifeprozess ähnelt dadurch in gewissen Aspekten der neonatalen und perinatalen Entwicklung (Zhan et al. 2019).

Eine Regeneration der Mikrogliapopulation durch myeloische Zellen scheint nur unter pathologischen Bedingungen zu erfolgen, bei denen die Mikroglia in ihrer Fähigkeit der Proliferation beeinträchtigt sind (Cronk et al. 2018). Neben Bestrahlung, Inflammation und einer Störung der Blut-Hirn-Schranke soll es auch andere pathologische Faktoren dafür geben (Flugel et al. 2001, Cronk et al. 2018). Es ist jedoch unklar, wie lange diese myeloischen Zellen im ZNS verbleiben sowie ob und wann sie durch lokale Mikroglia ersetzt werden (Flugel et al. 2001).

Bezüglich des Ursprungs der regenerierten Mikroglia scheint es allerdings Unterschiede zwischen den ZNS-Kompartimenten zu geben. Huang *et al.* belegten mithilfe einer *fate-mapping*-Technik, dass die mikrogliale Regeneration in der Retina aus zwei verschiedenen Populationen mit unterschiedlichen Ursprüngen entstammte (Huang et al. 2018a). Im Gegensatz zum Gehirn erfolgte die mikrogliale Regeneration nicht aus lokaler Selbsterneuerung. Stattdessen stammte der Großteil (etwa 85 %) der regenerierten Mikroglia von der Proliferation residualer Mikroglia aus dem optischen Nerv ab, während ein kleinerer Anteil in der Peripherie von Makrophagen aus dem Ziliarkörper und der Iris stammten (Huang et al. 2018a). Ähnlich wie in der Entwicklung des Auges migrieren die regenerierten Mikroglia vom Zentrum in die Peripherie sowie

von der Peripherie zum Zentrum (vgl. Abbildung 19) (Diaz-Araya et al. 1995, Marin-Teva et al. 1999b, Santos et al. 2008, Huang et al. 2018a).

Die regenerierten Mikroglia in der Peripherie zeigten eine weniger verzweigte Morphologie als solche um den optischen Nerv in der Zentralregion. Im Gegensatz zur transienten Migration von Makrophagen in das erkrankte ZNS scheinen die regenerierten Mikroglia langlebige Zellen der Retina zu werden, da sie auch nach zwei Monaten noch nachgewiesen werden konnten (Huang et al. 2018a).

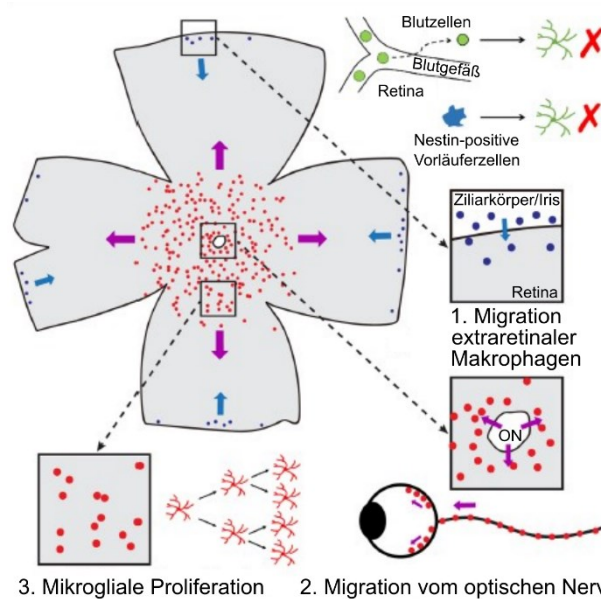


Abbildung 19: Darstellung des unterschiedlichen mikroglialen Ursprungs in der Retina anhand eines *whole-mount*-Präparates: 1. Aus dem Ziliarkörper/Iris, 2. Aus dem optischen Nerv, 3. Durch mikrogliale Proliferation. Blutzellen oder Nestin-positive Vorläuferzellen bilden keine regenerierten Mikroglia. ON = optischer Nerv. Modifiziert nach (Huang et al. 2018a).

Aufgrund der beschriebenen unterschiedlichen Ursprünge wurde bei der morphologischen Analyse dieser Arbeit zwischen Mikroglia der Peripherie und der Zentralregion der Retina unterschieden. Bereits im Vergleich aller Behandlungsgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Regionen. In der Zentralregion wiesen Mikroglia eine größere Länge, Fläche und ein größeres Volumen auf als in der Peripherie. Jedoch zeigten sie eine geringere Gesamtsumme an Schnittpunkten der Zellfortsätze mit den Sholl-Radien. Um eine Aussage darüber treffen zu können, in welcher Behandlungsgruppe die meisten Unterschiede zu finden waren, erfolgte in jeder Behandlungsgruppe separat der Vergleich zwischen den beiden Regionen. Auffällig war, dass insbesondere in den beiden Regenerationsgruppen Unterschiede zu finden waren. Allein in der Betrachtung des

maximalen Verzweigungsgrads stach die junge Depletionsgruppe hervor (vgl. Abbildung 15). In der Einzelbetrachtung der Regionen zeigte sich, dass diese Zellen einen höheren maximalen Verzweigungsgrad aufwiesen als die junge Kontrollgruppe sowie die junge Regenerationsgruppe. Der Grund für einen höheren Verzweigungsgrad dieser nicht depletierten Zellen bleibt ungeklärt. Allerdings gibt es zu bedenken, dass die Stichprobengröße in den Depletionsgruppen sehr gering war. In der alten Regenerationsgruppe fand sich dagegen ein umgekehrt signifikanter Unterschied. Dort wiesen die Zellen in der Zentralregion einen um 1,1 höheren maximalen Verzweigungsgrad auf als in der Peripherie. Zusätzlich nahmen Mikroglia in der Zentralregion der alten Regenerationsgruppe eine größere territoriale Fläche ein als in der Peripherie (vgl. Abbildung 15). Weitere Unterschiede wies die junge Regenerationsgruppe auf. Mikroglia der jungen Regenerationsgruppe wiesen eine höhere Gesamtlänge der Fortsätze sowie eine größere territoriale Fläche in der Zentralregion als in der Peripherie auf (vgl. Abbildung 15). Die Gesamtmenge der Schnittpunkte mit den Sholl-Radien war in der Zentralregion jedoch geringer als in der Peripherie (vgl. Abbildung 13).

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass Mikroglia in der Zentralregion und in der Peripherie der Retina unterschiedliche Regenerationsursprünge nach pharmakologischer Depletion mit PLX5622 besitzen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Huang *et al.* konnte in der Peripherie keine geringere Verzweigung nachgewiesen werden, sondern eine verminderte territoriale Fläche und Gesamtlänge der Fortsätze (Huang *et al.* 2018a). Dies steht jedoch nicht im Widerspruch, da Mikroglia mit Abnahme der Verzweigungen eine geringere territoriale Fläche einnehmen. In der vorliegenden Arbeit bestanden keine signifikanten Unterschiede in den weiteren morphologischen Parametern. Allerdings konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass diese morphologischen Unterschiede zwischen den beiden Regionen nicht nur in jungen (2-3,5 Monate), sondern auch in alten Mäusen (24,5-27 Monate) nachweisbar sind. Bisher wurde die Depletion und Regeneration der retinalen Mikroglia hauptsächlich in jungen (2 Monate alten) Mäusen erforscht (Ebner *et al.* 2017, Hilla *et al.* 2017, Huang *et al.* 2018a, Zhang *et al.* 2018). Die vorliegende Arbeit liefert wichtige Informationen im Vergleich der Altersgruppen.

Anders als bei Huang *et al.* fand keine 100 %-ige Depletion der Mikroglia statt. Es bleibt deshalb nicht auszuschließen, dass eine mikrogliale Regeneration auch durch eine lokale Proliferation nicht depletierter Mikroglia erfolgte. In zukünftigen Studien könnte dem durch eine *fate-mapping*-Technik oder durch *in vivo live cell imaging* entgegengewirkt werden. Vielversprechend scheinen ebenso die neueren Erkenntnisse der Gen- und Transkriptomanalysen zu sein, die spezifische Gensignaturen für Mikroglia aufwiesen und zugänglich machten (Hickman et al. 2013, Butovsky et al. 2014, Bennett et al. 2016). Eins dieser Genkandidaten ist Sall1, dessen Expression im adulten ZNS, der Retina und im hämatopoetischen System auf Mikroglia beschränkt ist und weder unter physiologischen noch unter pathologischen Bedingungen von einwandernden Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Buttgereit et al. 2016, Koso et al. 2016, Shemer et al. 2018). Auch unter einer mikroglialen Depletion und Regeneration bleibt die unterschiedliche Expression bestehen (Buttgereit et al. 2016). Deshalb wäre es interessant, die Methodik dieser Arbeit in zukünftigen Studien um eine Doppelfärbung sowie Genanalyse mit dem Transkriptionsfaktor Sall1 zu erweitern.

7.3 Analyse der Genexpression in jungen und alten Mausretinae

In dieser Arbeit wurde mittels qPCR die Expression spezifischer Gene in den Retinae junger und alter Mäuse untersucht, um sie anschließend mit der Wirkung mikroglialer Depletion und Regeneration zu vergleichen. Als wichtige proinflammatorische Gene und Marker mikroglialer Aktivierung wurden die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α ausgewählt. IL-1 β ist in der Regulierung der angeborenen Immunantwort involviert und wird insbesondere von myeloischen Zellen, Mikroglia und Astrozyten produziert. Es wird angenommen, dass IL-1 β eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung und Verbreitung von Neuroinflammation in vielen neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer-Krankheit, Multiplen Sklerose aber auch der altersbedingten Makuladegeneration, dem Glaukom und der diabetischen Retinopathie, einnimmt (Mendiola und Cardona 2018). Ebenso sind TNF- α und IL-6 bedeutende proinflammatorische Zytokine, denen in der Neuroinflammation und retinalen Pathologien eine wichtige Rolle zukommt (Akhtar-Schafer et al. 2018, Silverman und Wong 2018, Rashid et al. 2019).

Sowohl für die proinflammatorischen als auch die antiinflammatorischen Zytokine stellen Mikroglia die hauptsächliche Quelle im ZNS und der Retina dar (Block und

Hong 2005). Deshalb wurde in dieser Arbeit untersucht, ob und in welcher Form eine mikrogliale Depletion und Regeneration Veränderungen in der Genexpression von inflammationsbezogenen Genen in jungen und alten Retinae bewirkt.

7.3.1 Alterungsabhängige Veränderungen in der retinalen Genexpression

In dieser Arbeit zeigte sich kein alterungsabhängiger Unterschied in der Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen in der Retina (vgl. Abbildung 17). In den untersuchten Retinae bestand keine erhöhte Neuroinflammation im Alter, wie sie von verschiedenen Studien beschrieben wurde (Lee et al. 2000, Godbout et al. 2005, Franceschi und Campisi 2014, Chen und Xu 2015). Im Gehirn und der Retina haben Mikroglia eine hohe Bedeutung für die Aufrechterhaltung einer Inflammation. Es wird angenommen, dass Mikroglia mit fortschreitendem Alter durch chronische Stimulierung präkonditioniert werden und auf inflammatorische Geschehen überreaktiv reagieren. Durch die Produktion vieler Zytokine und Chemokine können sie für das Inflammationsprofil des ZNS im Alter mitursächlich sein und neurodegenerative Prozesse verstärken (Sierra et al. 2007, Wong 2013). mRNA-Analysen wiesen auf, dass alternde Mikroglia eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α aufweisen (Sheng et al. 1998, Sierra et al. 2007). Aber auch die mRNA antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 und TGF- β sind im Alter erhöht (Sierra et al. 2007). Da mRNA-Transkripte nicht zwangsweise den Sekretionsleveln entsprechen, wurden *in vitro* Studien isolierter Mikroglia durchgeführt. Kultivierte Mikroglia aus alten Gehirnen zeigen erhöhte Basallevel von IL-1, IL-6 und TNF- α und eine verstärkte Lipopolysaccharid-induzierte Produktion von IL-6, TNF- α und IL-1 β verglichen mit kultivierten Mikroglia junger Gehirne (Ye und Johnson 1999, Xie et al. 2003, Njie et al. 2012).

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen nur begrenzt Rückschlüsse auf die Genexpression der Mikroglia zu. Dafür müssen Mikroglia in zukünftigen Studien von den Retinae extrahiert und getrennt analysiert werden. Dennoch zeigte sich, dass die Genexpression von CD68 in der alten Kontrollgruppe signifikant höher war als in der jungen Kontrollgruppe (s. Abbildung 18). CD68 ist ein transmembranes, lysosomal-assoziiertes Glykoprotein, welches insbesondere von monozytären Zelllinien wie zirkulierenden Makrophagen und Gewebsmakrophagen, insbesondere Mikroglia, exprimiert wird. Es zeigt eine Aktivierung und Phagozytoseaktivität dieser Zellen an

(Rabinowitz und Gordon 1991, Holness et al. 1993, Li et al. 1998). In der Literatur wurde eine Hochregulation von CD68 in alten Mikroglia beschrieben (Perry et al. 1993, Kullberg et al. 2001, Wong et al. 2005, Safaiyan et al. 2016). Auch konnte eine erhöhte basale mikrogliale Aktivierung in alten humanen Gehirnen festgestellt werden (Schuitemaker et al. 2012). Da in der Retina hauptsächlich Mikroglia als ortsansässige Gewebsmakrophagen CD68 produzieren, unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit die Annahme einer erhöhten Aktivierung der Mikroglia in alten Retinae.

In verschiedensten Geweben führt Alterung zu einer Hochregulation von p16. Welche Zelltypen dabei vorrangig verantwortlich sind, ist nicht bekannt (Krishnamurthy et al. 2004). p16 ist ein selektiver Cyclin D abhängiger CDK4/6 Inhibitor, der den Zellzyklus reguliert und diesen stoppen kann (Serrano et al. 1993). In einigen Zelltypen zeigte sich auch eine physiologische Genexpression von p16, wie beispielsweise in der Zellpolarisierung von Makrophagen (Hall et al. 2017). Dennoch gilt p16 als einer der wichtigsten Seneszenzmarker *in vivo* wie *in vitro* (Sharpless und Sherr 2015). In dieser Arbeit konnte eine signifikante Hochregulation von p16 im Alter festgestellt werden, während die Genexpression von p53 sowie p21 unverändert blieben (vgl. Abbildung 18). Die Ergebnisse weisen auf eine Bedeutung der Hochregulation von p16 im Alter hin, aber auch hier bleibt der zelluläre Ursprung offen. In früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass p16 in Mikroglia alter Mausgehirne signifikant hochreguliert wird, während die Genexpression von p53 und p21 unverändert bleiben (Stojiljkovic et al. 2019). In zukünftigen Studien sollte ein Fokus auf den zellulären Ursprung der Hochregulation von p16 in alten Retinae gelegt werden. Sollten überwiegend die Mikroglia für die erhöhte Expressionsrate von p16 verantwortlich sein, ist dessen Rolle in der veränderten mikroglialen Aktivierung bei fehlender Hochregulation anderer Seneszenzmarker nicht auszuschließen.

7.3.2 Auswirkung der mikroglialen Depletion auf die retinale Genexpression

Mikroglia sind zwar die wichtigsten, jedoch nicht die einzigen Zelltypen, die an der Modulation der Neuroinflammation beteiligt sind. Auch Astrozyten, Endothelzellen, perivaskuläre Makrophagen und zu einem geringeren Anteil auch Neurone und periphere Immunzellen tragen zur Produktion proinflammatorischer wie auch antiinflammatorischer Zytokine bei (Sierra et al. 2014). Die genauen Auswirkungen einer mikroglialen Depletion auf andere retinale Zelltypen durch fehlende

Kommunikation der Mikroglia sind weiterhin ungeklärt. Spangenberg *et al.* stellten fest, dass Mäuse auch nach einer sechsmonatigen mikroglialen Depletion durch PLX5622 keine Verhaltensänderungen aufweisen (Spangenberg *et al.* 2019). Unter physiologischen Bedingungen dienen Mikroglia der Beseitigung apoptotischer Zellen und Zelltrümmer (Saijo und Glass 2011). Eine Depletion durch PLX5622 bewirkt eine Entfernung dieser aufräumenden Zellen, der genaue Vorgang und wohin die Zellen verschwinden, ist bisher kaum untersucht. Welchen Einfluss das vermehrte Auftreten apoptotischer Mikroglia auf das retinale Gewebe besitzt, ist deshalb nicht gänzlich bekannt.

In dieser Arbeit dienten die Werte der Genexpressionsanalyse der jungen und alten Kontrollgruppe als Basalwerte, um die Auswirkungen der mikroglialen Depletion und Regeneration auf die Gesamtretna zu untersuchen. Dadurch war eine indirekte Betrachtung des mikroglialen Einflusses auf die retinale Genexpression möglich. Es zeigte sich, dass die mikrogliale Depletion von 14 Tagen keinen Einfluss auf die Genexpression der Retina hatte. Es traten keinerlei signifikante Unterschiede in den untersuchten Genen auf (vgl. Abbildung 17 und Abbildung 18). Ähnlich verhielt es sich in einer Arbeit von Wang *et al.*, die ebenso keine Veränderungen in der Genexpression von IL-1 β , TNF- α und IL-6 aufweisen konnten (Wang *et al.* 2016). Auch Transkriptomanalysen zeigten, dass die mikrogliale Depletion mit PLX5622 keinen Zytokinsturm oder Astrogliose auslöste, wie es bei anderen Depletionsmethoden der Fall war (Bruttger *et al.* 2015, Huang *et al.* 2018a, Huang *et al.* 2018b, Lund *et al.* 2018). Stattdessen zeigten mRNA mikroglialer Marker wie CD68 eine signifikante Abnahme (Huang *et al.* 2018a, O'Neil *et al.* 2018). In einer *ex vivo* Studie konnten Coleman *et al.* sogar zeigen, dass insbesondere die mRNA für IL-1 β und TNF- α bei mikroglialer Depletion abnehmen, während Interferon- α und Interferon- γ erhalten bleiben (Coleman *et al.* 2020). Dies konnte jedoch noch in keiner *in vivo* Studie nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen somit die Aussage, dass die mikrogliale Depletion keine weitreichenden Veränderungen in der Genexpression der Retina bewirkt. Es handelte sich jedoch nur um eine begrenzte Auswahl an Genen und stellt keine umfassende Betrachtung dar. Weiterhin war die Stichprobengröße insbesondere der alten Gruppen sehr gering. Dies könnte erklären, dass keine

signifikante Abnahme der mRNA Level von CD68 weder in jungen noch alten Retinae auftrat. CD68 wird im ZNS und der Retina hauptsächlich von Mikroglia sowie eingewanderten Makrophagen exprimiert (Yang et al. 2009). Da die immunhistochemische Betrachtung eine 84 %-ige Entfernung der Mikroglia durch die Behandlung mit PLX5622 aufwies, wäre zu erwarten gewesen, dass sich dies in einer Abnahme der mRNA Level von CD68 widerspiegeln würde.

Interessant wäre in zukünftigen Studien die Betrachtung makroglialer Gene, da eine mikrogliale Depletion zu veränderten mRNA Level von GFAP (*glial fibrillary acidic protein*), S100 und Vimentin führen kann (Wang et al. 2016). Diese Veränderungen bedeuten, dass Makroglia die Abwesenheit der Mikroglia sehr wohl wahrnehmen und darauf reagieren. Die funktionelle Bedeutung ist bisher noch unklar. Weitere Studien zu den Auswirkungen der mikroglialen Depletion und Regeneration auf Makroglia in der Retina sollten erfolgen.

7.3.3 Auswirkung der mikroglialen Regeneration auf die retinale Genexpression

Mikroglia alter Retinae und des ZNS werden als präkonditioniert und überreaktiv proinflammatorisch beschrieben (Sierra et al. 2007, Wong 2013). Gezielte Entfernung und Ersetzen dieser Zellen durch neue, unkonditionierte Mikroglia könnte eine wichtige Option in der Therapie neurodegenerativer Erkrankungen darstellen.

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass die junge regenerierte Retina eine signifikante Hochregulation des Tumorsuppressorgens p53 im Vergleich zur jungen Kontrollgruppe aufwies (s. Abbildung 18). p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der in der Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur, Apoptose und zellulärer Stressantwort involviert ist. Er gilt aufgrund seiner Fähigkeit zelluläre Proliferation zu stoppen und Apoptose zu induzieren als stärkstes Tumorsuppressorgen. Durch die Regulierung einer Vielzahl von Zielgenen beeinflusst p53 zahlreiche physiologische und metabolische Signalwege, welche in der Regulation von Alterung und Seneszenz beteiligt sind. Eins dieser Zielgene zur Etablierung eines irreversiblen Zellzyklusarrestes stellt p21 dar (Xiong et al. 1993, Itahana et al. 2001, Rufini et al. 2013, Sharpless und Sherr 2015). p21 und p16 waren jedoch in keiner der Behandlungsgruppen signifikant erhöht (vgl. Abbildung 18). Daraus lässt sich ableiten, dass die erhöhte Expressionsrate von p53 in der jungen Regenerationsgruppe vermutlich nicht auf eine Seneszenzinduktion, sondern auf einen anderen Signalweg hindeutet. Eine mögliche Erklärung könnte die Regulation von Apoptose darstellen (Fridman und Lowe 2003). In der jungen

Regenerationsgruppe gab es einen Anstieg von 39 % der Mikrogliaanzahl. Im Gehirn konnte nachgewiesen werden, dass die anfängliche Überschreitung der Zellzahl bei mikroglialer Regeneration nach einigen Wochen zurückgeht und sich die Zellzahl ihrem basalen Wert annähert (Elmore et al. 2018). Unter physiologischen Bedingungen ist die mikrogliale Proliferation stets mit parallel ablaufender Apoptose verbunden, sodass ihre Anzahl stets konstant bleibt (Askew et al. 2017, Zhan et al. 2019). Eine erhöhte Proliferation führt zur vermehrten Apoptose, was sich in der Angleichung der Zellzahlen widerspiegelt. Die deutlich geringere Überschreitung der Zellzahlen von 20 % in der alten Regenerationsgruppe könnte erklären, dass auch deutlich weniger Apoptose stattfand oder durch die geringe Stichprobenzahl keine statistische Signifikanz nachweisbar war. Auch in den Depletionsgruppen wäre ein Anstieg von p53 durch die PLX5622-induzierte Apoptose der Mikroglia zu erwarten gewesen. Da der Großteil der Mikroglia jedoch bereits in der ersten Woche der Behandlung mit PLX5622 entfernt werden (Ebner et al. 2017, Hilla et al. 2017, Elmore et al. 2018), ist der nicht vorhandene Anstieg von p53 nach einer 14-tägigen Depletion durch eine bereits abgeschlossene mikrogliale Apoptose erklärbar. Interessant wäre in zukünftigen Studien neben einer zeitlichen Analyse der Apoptose auch die Ermittlung der Expressionsrate von p53 zu Beginn der Depletion sowie zu Beginn und zum vollständigen Abschluss der Regeneration. Insbesondere am vierten Tag der Regeneration wiesen Zhan *et al.* eine hohe Rate an Apoptose auf (Zhan et al. 2019).

In einer *ex vivo* Studie kehrten die mRNA Level proinflammatorischer Zytokine, insbesondere IL-1 β und TNF- α , nach einer Regeneration wieder zu Basallevel zurück, während antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 und der Phagozytosemarker CD68 verstärkt exprimiert wurden. Die Zellen zeigten einen vermehrt antiinflammatorischen und trophisch wirksamen Phänotyp (Coleman et al. 2020). In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in den mRNA Leveln von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen nachgewiesen werden. Auch die Genexpression des Phagozytose- und Aktivierungsmarkers CD68 zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den Kontrollgruppen. O'Neil *et al.* beschrieben dagegen, dass eine mikrogliale Depletion und Regeneration eine Normalisierung erhöhter CD68 Expressionslevel alter Mikroglia zu adulten Basallevel bewirkt (O'Neil et al. 2018).

Transkriptomanalysen zwischen Kontroll- und Regenerationsgruppen wiesen sowohl im ZNS wie in der Retina kaum Unterschiede auf, was darauf hindeutet, dass regenerierte und residuale Mikroglia eine ähnliche Funktion aufweisen (Huang et al. 2018a, Huang et al. 2018b). Andererseits könnte dies ebenso bedeuten, dass die Regeneration der Mikroglia keine langanhaltenden Veränderungen der Mikroumgebung bewirkt, sondern sich im Gegenteil die regenerierten Mikroglia wieder der Mikroumgebung anpassen. So beschreiben O'Neil *et al.*, dass eine forcierte mikrogliale Regeneration zwar eine partielle Aufhebung der altersinduzierten transkriptionellen Veränderungen und der Akkumulierung von Lipofuszin, jedoch keine Veränderungen der verstärkten proinflammatorischen Signalwege bewirkt. Sie erklären dies damit, dass die altersinduzierte Präkonditionierung der Mikroglia nicht intrinsisch erfolgt, sondern dass diese eine Anpassung an die altersinduzierten Veränderungen erhöhter Inflammation, Oxidation oder Schäden der ZNS-Mikroumgebung darstellt. Die mikrogliale Depletion und Regeneration scheint keinen bedeutenden Einfluss auf die Mikroumgebung zu haben, sodass sich die Zellen nach der Regeneration wieder ihrer Umgebung anpassen und einen altersinduzierten Phänotyp aufweisen (O'Neil et al. 2018). In der Literatur wird ein starker Einfluss der Mikroumgebung auf die Epigenetik und Genexpression von Makrophagen und Mikroglia beschrieben (Gosselin et al. 2014, Lavin et al. 2014). Interessanterweise konnten Gosselin *et al.* durch einen Transfer aus dem Gehirn entnommener Mikroglia zu *in vitro* Kulturen transkriptionelle Veränderungen ähnlich der Veränderungen in neurodegenerativen Erkrankungen nachweisen (Gosselin et al. 2017). Dennoch ist nicht nur die Mikroumgebung entscheidend für die genetische und funktionelle Identität der Mikroglia, sondern auch ihr embryologischer Ursprung. Eingewanderte Makrophagen ins ZNS nehmen zwar eine Mikroglia-ähnliche Identität an, bleiben aber in ihrer Epigenetik, Genexpression und Funktion verschieden (Bennett et al. 2018, Cronk et al. 2018, Lund et al. 2018, Shemer et al. 2018). Derartige Unterschiede können sowohl positive als auch negative Auswirkungen bei Pathologien des ZNS und der Retina bewirken (Simard et al. 2006, Ajami et al. 2011, Yamasaki et al. 2014, Paschalis et al. 2018). Weitere Studien sind deshalb nötig, um die Möglichkeit einer Kombination aus mikroglialer Depletion und Ersetzen durch Mikroglia-ähnliche Zellen für therapeutische Zwecke zu ergründen.

8 Schlussfolgerungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte erstmals belegt werden, dass eine pharmakologische Depletion der Mikroglia durch den CSF1R-Inhibitor PLX5622 sowohl in jungen wie auch in alten Mausretinae die gleiche Wirkung zeigt. In beiden Altersgruppen konnten 84 % der Mikroglia entfernt werden. Ein Absetzen von PLX5622 bewirkte in beiden Altersgruppen eine erhöhte Proliferation der Mikroglia. Signifikante Unterschiede zwischen jungen und alten Mikroglia konnten weder in der Anzahl und Verteilung innerhalb der retinalen Schichten noch in den morphologischen Analysen aufgezeigt werden. Die in der Literatur beschriebenen alterungsabhängigen morphologischen Veränderungen blieben aus.

Ebenso zeigte sich kein vermehrt proinflammatorisches Genprofil in alten Retinae, dagegen aber eine Hochregulation von CD68, was auf eine vermehrte Aktivierung der Mikroglia hindeuten könnte. Weiterhin zeigte sich eine Hochregulation von p16. Eine Seneszenzinduktion im Alter ist nicht auszuschließen, konnte jedoch nicht durch alle drei verwendeten Seneszenzmarker nachgewiesen werden. Wie in der Literatur bereits beschrieben, bestätigte sich im Rahmen dieser Arbeit, dass die mikrogliale Depletion keine signifikanten Veränderungen in der Genexpression ausgewählter Gene der Retina bewirkte. Bei mikroglialer Regeneration zeigte sich eine signifikante Hochregulation von p53, die auf eine erhöhte Apoptose hindeuten könnte.

Darüber hinaus wurde in dieser Arbeit ein Fokus auf die morphologischen Veränderungen zwischen den Retinaregionen der Peripherie und der Zentralregion gelegt. Die dabei aufgezeigten signifikanten Unterschiede gaben Hinweise auf einen unterschiedlichen Ursprung oder Subtypen der Mikroglia und bieten Potential für weiterfolgende Studien. Es ist noch nicht bekannt, welche unterschiedlichen Rollen diese Subpopulationen von Mikroglia in der physiologischen Retina spielen. Erkenntnisse in diesem Bereich können helfen, ihre Bedeutung in pathologischen Zuständen retinaler Erkrankungen zu ergründen und spezifischere Therapieoptionen zu entwickeln.

Bisher fehlten Strategien, um zwischen Mikroglia und eingewanderten Makrophagen zu unterscheiden, da sie weitreichend ähnliche morphologische, immunologische und genetische Übereinstimmungen aufweisen. Erste Erkenntnisse über einen unterschiedlichen Ursprung lieferten *fate-mapping*-Techniken (Bruttger et al. 2015, Huang et al. 2018a). Vielversprechend scheinen ebenso die neueren Erkenntnisse der Gen- und Transkriptomanalysen zu sein, die spezifische Gensignaturen für Mikroglia

aufwiesen und zugänglich machten (Butovsky et al. 2014, Bennett et al. 2016, Buttgereit et al. 2016, Koso et al. 2016). Deshalb wäre es interessant, die Methodik dieser Arbeit in zukünftigen Studien in der Immunhistochemie sowie der Genanalyse um spezifischere Mikroglia-Marker zu erweitern, um genauere Aussagen über den Ursprung der Mikroglia treffen zu können. Ebenso sollte die immunhistochemische Färbung um einen mikroglialen Aktivierungsmarker erweitert werden, da die Morphologie allein keinen Hinweis auf den Funktionszustand der Mikroglia geben kann. Hier würden sich sowohl CD68 als auch MHC II anbieten, da beide Gene in einem breiten Spektrum der mikroglialen Aktivierung hochreguliert werden (Hendrickx et al. 2017).

Es ist belegt, dass Mikroglia mit einer Vielzahl von neurodegenerativen Erkrankungen assoziiert sind. Deshalb ist es wichtig, weitere Erkenntnisse über die verschiedenen Subtypen an Mikroglia und ihrer physiologischen wie pathologischen Funktionen und ihrer Veränderung im Alter zu erlangen. Die Verwendung von PLX5622 stellt eine Methode dar, Mikroglia spezifisch aus dem Gewebe zu entfernen und eine Regeneration der Mikroglia-Population nach Absetzen zu bewirken. In einigen ZNS-Erkrankungen und -Pathologien (Dagher et al. 2015, Klein et al. 2015, Acharya et al. 2016, Janova et al. 2018, Spangenberg et al. 2019) wie auch in Pathologien der Retina (Kokona et al. 2018) konnten vorteilhafte Effekte nachgewiesen werden. Da diese Depletionsmethode jedoch Mikroglia aus sämtlichen Hirnregionen entfernt, ist es wichtig, die Wirkung in jeder Region zu kennen und ihre Nebeneffekte abwägen zu können, da auch nachteilige Effekte bei bestimmten ZNS-Erkrankungen (Wheeler et al. 2018, Sanchez et al. 2019) und Funktionen der Retina (Wang et al. 2016, Paschalis et al. 2018) beschrieben wurden.

Ebenso bedeutend ist eine Charakterisierung und Modifizierung der Mikroumgebung des ZNS sowie der Retina, da sich (regenerierte) Mikroglia nachweislich ihrer Umgebung anpassen (Bennett et al. 2018, O'Neil et al. 2018). Ein möglicher Therapieeffekt könnte dadurch verhindert werden.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Acharya MM, Green KN, Allen BD, Najafi AR, Syage A, Minasyan H, Le MT, Kawashita T, Giedzinski E, Parihar VK, West BL, Baulch JE, Limoli CL. 2016. Elimination of microglia improves cognitive function following cranial irradiation. *Sci Rep*, 6:31545.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FM. 2007. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 10 (12):1538-1543.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. 2011. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*, 14 (9):1142-1149.
- Akhtar-Schafer I, Wang L, Krohne TU, Xu H, Langmann T. 2018. Modulation of three key innate immune pathways for the most common retinal degenerative diseases. *EMBO Mol Med*, 10 (10).
- Alliot F, Godin I, Pessac B. 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Developmental Brain Research*, 117 (2):145-152.
- Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. *Glia*, 36 (2):165-179.
- Angelova DM, Brown DR. 2019. Microglia and the aging brain: are senescent microglia the key to neurodegeneration? *J Neurochem*, 151 (6):676-688.
- Askew K, Li K, Olmos-Alonso A, Garcia-Moreno F, Liang Y, Richardson P, Tipton T, Chapman MA, Riecken K, Beccari S, Sierra A, Molnar Z, Cragg MS, Garaschuk O, Perry VH, Gomez-Nicola D. 2017. Coupled Proliferation and Apoptosis Maintain the Rapid Turnover of Microglia in the Adult Brain. *Cell Rep*, 18 (2):391-405.
- Banati RB. 2003. Neuropathological imaging: in vivo detection of glial activation as a measure of disease and adaptive change in the brain. *British Medical Bulletin*, 65:121-+.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. 1993. Cytotoxicity of microglia. *Glia*, 7 (1):111-118.
- Bayraktar OA, Fuentealba LC, Alvarez-Buylla A, Rowitch DH. 2014. Astrocyte development and heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7 (1):a020362.
- Bennett FC, Bennett ML, Yaqoob F, Mulinyawe SB, Grant GA, Hayden Gephart M, Plowey ED, Barres BA. 2018. A Combination of Ontogeny and CNS Environment Establishes Microglial Identity. *Neuron*, 98 (6):1170-1183 e1178.
- Bennett ML, Bennett FC, Liddel SA, Ajami B, Zamanian JL, Fernhoff NB, Mulinyawe SB, Bohlen CJ, Adil A, Tucker A, Weissman IL, Chang EF, Li G, Grant GA, Hayden Gephart MG, Barres BA. 2016. New tools for studying microglia in the mouse and human CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (12):E1738-1746.
- Bergles DE, Richardson WD. 2015. Oligodendrocyte Development and Plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8 (2):a020453.
- Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW. 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends Neurosci*, 30 (11):596-602.
- Block ML, Hong JS. 2005. Microglia and inflammation-mediated neurodegeneration: multiple triggers with a common mechanism. *Prog Neurobiol*, 76 (2):77-98.
- Brockhaus J, Moller T, Kettenmann H. 1996. Phagocytosing amoeboid microglial cells studied in a mouse corpus callosum slice preparation. *Glia*, 16 (1):81-90.

- Brown GC, Neher JJ. 2014. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*, 15 (4):209-216.
- Bruttger J, Karram K, Wortge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, Klein M, Blank T, Yona S, Wolf Y, Mack M, Pinteaux E, Muller W, Zipp F, Binder H, Bopp T, Prinz M, Jung S, Waisman A. 2015. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity*, 43 (1):92-106.
- Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE, Fanek Z, Liu L, Chen Z, Rothstein JD, Ransohoff RM, Gygi SP, Antel JP, Weiner HL. 2014. Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci*, 17 (1):131-143.
- Butowski N, Colman H, De Groot JF, Omuro AM, Nayak L, Wen PY, Cloughesy TF, Marimuthu A, Haidar S, Perry A, Huse J, Phillips J, West BL, Nolop KB, Hsu HH, Ligon KL, Molinaro AM, Prados M. 2016. Orally administered colony stimulating factor 1 receptor inhibitor PLX3397 in recurrent glioblastoma: an Ivy Foundation Early Phase Clinical Trials Consortium phase II study. *Neuro Oncol*, 18 (4):557-564.
- Buttgereit A, Lelios I, Yu X, Vrohligs M, Krakoski NR, Gautier EL, Nishinakamura R, Becher B, Greter M. 2016. Sall1 is a transcriptional regulator defining microglia identity and function. *Nat Immunol*, 17 (12):1397-1406.
- Catalin B, Alexandru D, Albu C, Iancau M. 2013. Microglia branching using a Sholl analysis method. *Curr Health Sci J*, supp4.
- Cengiz P, Zafer D, Chandrashekhara JH, Chanana V, Bogost J, Waldman A, Novak B, Kintner DB, Ferrazzano PA. 2019. Developmental differences in microglia morphology and gene expression during normal brain development and in response to hypoxia-ischemia. *Neurochem Int*.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. 2007. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*, 53 (2):344-354.
- Chen GY, Nunez G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10 (12):826-837.
- Chen M, Xu H. 2015. Parainflammation, chronic inflammation, and age-related macular degeneration. *J Leukoc Biol*, 98 (5):713-725.
- Chen M, Muckersie E, Forrester JV, Xu H. 2010. Immune activation in retinal aging: a gene expression study. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51 (11):5888-5896.
- Coleman LG, Jr., Zou J, Crews FT. 2020. Microglial depletion and repopulation in brain slice culture normalizes sensitized proinflammatory signaling. *J Neuroinflammation*, 17 (1):27.
- Colton C, Wilcock DM. 2010. Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9 (2):174-191.
- Conde JR, Streit WJ. 2006. Effect of aging on the microglial response to peripheral nerve injury. *Neurobiol Aging*, 27 (10):1451-1461.
- Crawford AH, Tripathi RB, Richardson WD, Franklin RJM. 2016. Developmental Origin of Oligodendrocyte Lineage Cells Determines Response to Demyelination and Susceptibility to Age-Associated Functional Decline. *Cell Rep*, 15 (4):761-773.
- Cronk JC, Filiano AJ, Louveau A, Marin I, Marsh R, Ji E, Goldman DH, Smirnov I, Geraci N, Acton S, Overall CC, Kipnis J. 2018. Peripherally derived macrophages can engraft the brain independent of irradiation and maintain an identity distinct from microglia. *J Exp Med*, 215 (6):1627-1647.
- Curcio CA, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE. 1990. Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol*, 292 (4):497-523.

- Dagher NN, Najafi AR, Kayala KM, Elmore MR, White TE, Medeiros R, West BL, Green KN. 2015. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents microglial plaque association and improves cognition in 3xTg-AD mice. *J Neuroinflammation*, 12:139.
- Damani MR, Zhao L, Fontainhas AM, Amaral J, Fariss RN, Wong WT. 2011. Age-related alterations in the dynamic behavior of microglia. *Aging Cell*, 10 (2):263-276.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8 (6):752-758.
- Davies DS, Ma J, Jegathees T, Goldsbury C. 2017. Microglia show altered morphology and reduced arborization in human brain during aging and Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 27 (6):795-808.
- Davis EJ, Foster TD, Thomas WE. 1994. Cellular forms and functions of brain microglia. *Brain Res Bull*, 34 (1):73-78.
- De Biase LM, Schuebel KE, Fufeld ZH, Jair K, Hawes IA, Cimbrow R, Zhang HY, Liu QR, Shen H, Xi ZX, Goldman D, Bonci A. 2017. Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron*, 95 (2):341-356 e346.
- Del Rio-Hortega P. 1939. The Microglia. *Lancet*, 233 (6036):1023-1026.
- Diaz-Araya CM, Provis JM, Penfold PL, Billson FA. 1995. Development of microglial topography in human retina. *J Comp Neurol*, 363 (1):53-68.
- Ebneter A, Kokona D, Jovanovic J, Zinkernagel MS. 2017. Dramatic Effect of Oral CSF-1R Kinase Inhibitor on Retinal Microglia Revealed by In Vivo Scanning Laser Ophthalmoscopy. *Transl Vis Sci Technol*, 6 (2):10.
- Elkabes S, DiCiccoBloom EM, Black IB. 1996. Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *Journal of Neuroscience*, 16 (8):2508-2521.
- Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN. 2014. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*, 82 (2):380-397.
- Elmore MRP, Hohsfield LA, Kramar EA, Soreq L, Lee RJ, Pham ST, Najafi AR, Spangenberg EE, Wood MA, West BL, Green KN. 2018. Replacement of microglia in the aged brain reverses cognitive, synaptic, and neuronal deficits in mice. *Aging Cell*, 17 (6):e12832.
- Erblich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW. 2011. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One*, 6 (10):e26317.
- Eter N, Engel DR, Meyer L, Helb HM, Roth F, Maurer J, Holz FG, Kurts C. 2008. In vivo visualization of dendritic cells, macrophages, and microglial cells responding to laser-induced damage in the fundus of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (8):3649-3658.
- Eysel U. 2010. Sehsystem und Augenbewegungen. In: Klinke R, Pape H-C, Kurtz A, Silbernagl S, Hrsg. *Physiologie*. 6. Aufl. Stuttgart: Thieme.
- Flanary BE, Streit WJ. 2004. Progressive telomere shortening occurs in cultured rat microglia, but not astrocytes. *Glia*, 45 (1):75-88.
- Flugel A, Bradl M, Kreutzberg GW, Graeber MB. 2001. Transformation of donor-derived bone marrow precursors into host microglia during autoimmune CNS inflammation and during the retrograde response to axotomy. *Journal of Neuroscience Research*, 66 (1):74-82.

- Fontainhas AM, Wang M, Liang KJ, Chen S, Mettu P, Damani M, Fariss RN, Li W, Wong WT. 2011. Microglial morphology and dynamic behavior is regulated by ionotropic glutamatergic and GABAergic neurotransmission. *PLoS One*, 6 (1):e15973.
- Franceschi C, Campisi J. 2014. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69 Suppl 1:S4-9.
- Frank MG, Barrientos RM, Biedenkapp JC, Rudy JW, Watkins LR, Maier SF. 2006. mRNA up-regulation of MHC II and pivotal pro-inflammatory genes in normal brain aging. *Neurobiol Aging*, 27 (5):717-722.
- Fridman JS, Lowe SW. 2003. Control of apoptosis by p53. *Oncogene*, 22 (56):9030-9040.
- Fuger P, Hefendehl JK, Veeraraghavalu K, Wendeln AC, Schlosser C, Obermüller U, Wegenast-Braun BM, Neher JJ, Martus P, Kohsaka S, Thunemann M, Feil R, Sisodia SS, Skodras A, Jucker M. 2017. Microglia turnover with aging and in an Alzheimer's model via long-term in vivo single-cell imaging. *Nat Neurosci*, 20 (10):1371-1376.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, Mehler MF, Conway SJ, Ng LG, Stanley ER, Samokhvalov IM, Merad M. 2010. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*, 330 (6005):841-845.
- Godbout JP, Chen J, Abraham J, Richwine AF, Berg BM, Kelley KW, Johnson RW. 2005. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice after activation of the peripheral innate immune system. *Faseb Journal*, 19 (7):1329-+.
- Gomez Perdiguero E, Klapproth K, Schulz C, Busch K, Azzoni E, Crozet L, Garner H, Trouillet C, de Bruijn MF, Geissmann F, Rodewald HR. 2015. Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 518 (7540):547-551.
- Gosselin D, Link VM, Romanoski CE, Fonseca GJ, Eichenfield DZ, Spann NJ, Stender JD, Chun HB, Garner H, Geissmann F, Glass CK. 2014. Environment drives selection and function of enhancers controlling tissue-specific macrophage identities. *Cell*, 159 (6):1327-1340.
- Gosselin D, Skola D, Coufal NG, Holtman IR, Schlachetzki JCM, Sajti E, Jaeger BN, O'Connor C, Fitzpatrick C, Pasillas MP, Pena M, Adair A, Gonda DD, Levy ML, Ransohoff RM, Gage FH, Glass CK. 2017. An environment-dependent transcriptional network specifies human microglia identity. *Science*, 356 (6344).
- Greter M, Lelios I, Pelczar P, Hoeffel G, Price J, Leboeuf M, Kundig TM, Frei K, Ginhoux F, Merad M, Becher B. 2012. Stroma-derived interleukin-34 controls the development and maintenance of langerhans cells and the maintenance of microglia. *Immunity*, 37 (6):1050-1060.
- Hall BM, Balan V, Gleiberman AS, Strom E, Krasnov P, Virtuoso LP, Rydkina E, Vujcic S, Balan K, Gitlin II, Leonova KI, Consiglio CR, Gollnick SO, Chernova OB, Gudkov AV. 2017. p16(Ink4a) and senescence-associated β -galactosidase can be induced in macrophages as part of a reversible response to physiological stimuli.
- Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, Walker AJ, Gergits F, Segel M, Nemesh J, Marsh SE, Saunders A, Macosko E, Ginhoux F, Chen J, Franklin RJM, Piao X, McCarroll SA, Stevens B. 2019. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*, 50 (1):253-271 e256.

- Han J, Zhu K, Zhang XM, Harris RA. 2019. Enforced microglial depletion and repopulation as a promising strategy for the treatment of neurological disorders. *Glia*, 67 (2):217-231.
- Hanisch UK, Kettenmann H. 2007. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10 (11):1387-1394.
- Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K. 2002. Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci*, 22 (21):9228-9236.
- Hayashi Y, Yoshida M, Yamato M, Ide T, Wu Z, Ochi-Shindou M, Kanki T, Kang D, Sunagawa K, Tsutsui H, Nakanishi H. 2008. Reverse of age-dependent memory impairment and mitochondrial DNA damage in microglia by an overexpression of human mitochondrial transcription factor a in mice. *J Neurosci*, 28 (34):8624-8634.
- Hayflick L. 1965. The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res*, 37:614-636.
- Haynes SE, Hollopeter G, Yang G, Kurpius D, Dailey ME, Gan WB, Julius D. 2006. The P2Y₁₂ receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci*, 9 (12):1512-1519.
- Hefendehl JK, Neher JJ, Suhs RB, Kohsaka S, Skodras A, Jucker M. 2014. Homeostatic and injury-induced microglia behavior in the aging brain. *Aging Cell*, 13 (1):60-69.
- Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I. 2017. Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology. *J Neuroimmunol*, 309:12-22.
- Henry CJ, Huang Y, Wynne AM, Godbout JP. 2009. Peripheral lipopolysaccharide (LPS) challenge promotes microglial hyperactivity in aged mice that is associated with exaggerated induction of both pro-inflammatory IL-1 β and anti-inflammatory IL-10 cytokines. *Brain Behav Immun*, 23 (3):309-317.
- Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, El Khoury J. 2013. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci*, 16 (12):1896-1905.
- Hilla AM, Diekmann H, Fischer D. 2017. Microglia Are Irrelevant for Neuronal Degeneration and Axon Regeneration after Acute Injury. *J Neurosci*, 37 (25):6113-6124.
- Holness CL, Dasilva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. 1993. Macrosialin, a Mouse Macrophage-Restricted Glycoprotein, Is a Member of the Lamp/Lgp Family. *Journal of Biological Chemistry*, 268 (13):9661-9666.
- Huang Y, Xu Z, Xiong S, Qin G, Sun F, Yang J, Yuan TF, Zhao L, Wang K, Liang YX, Fu L, Wu T, So KF, Rao Y, Peng B. 2018a. Dual extra-retinal origins of microglia in the model of retinal microglia repopulation. *Cell Discov*, 4:9.
- Huang Y, Xu Z, Xiong S, Sun F, Qin G, Hu G, Wang J, Zhao L, Liang YX, Wu T, Lu Z, Humayun MS, So KF, Pan Y, Li N, Yuan TF, Rao Y, Peng B. 2018b. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat Neurosci*, 21 (4):530-540.
- Imai Y, Kohsaka S. 2002. Intracellular signaling in M-CSF-induced microglia activation: role of Iba1. *Glia*, 40 (2):164-174.
- Imai Y, Ibata I, Ito D, Ohsawa K, Kohsaka S. 1996. A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein

- expressed in a monocytic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*, 224 (3):855-862.
- Itahana K, Dimri G, Campisi J. 2001. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*, 268 (10):2784-2791.
- Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. 1998. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*, 57 (1):1-9.
- Janova H, Arinrad S, Balmuth E, Mitjans M, Hertel J, Habes M, Bittner RA, Pan H, Goebbels S, Begemann M, Gerwig UC, Langner S, Werner HB, Kittel-Schneider S, Homuth G, Davatzikos C, Volzke H, West BL, Reif A, Grabe HJ, Boretius S, Ehrenreich H, Nave KA. 2018. Microglia ablation alleviates myelin-associated catatonic signs in mice. *J Clin Invest*, 128 (2):734-745.
- Jinno S, Fleischer F, Eckel S, Schmidt V, Kosaka T. 2007. Spatial arrangement of microglia in the mouse hippocampus: a stereological study in comparison with astrocytes. *Glia*, 55 (13):1334-1347.
- Kanazawa H, Ohsawa K, Sasaki Y, Kohsaka S, Imai Y. 2002. Macrophage/microglia-specific protein Iba1 enhances membrane ruffling and Rac activation via phospholipase C-gamma -dependent pathway. *J Biol Chem*, 277 (22):20026-20032.
- Kaneko H, Nishiguchi KM, Nakamura M, Kachi S, Terasaki H. 2008. Characteristics of bone marrow-derived microglia in the normal and injured retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (9):4162-4168.
- Karlstetter M, Scholz R, Rutar M, Wong WT, Provis JM, Langmann T. 2015. Retinal microglia: just bystander or target for therapy? *Prog Retin Eye Res*, 45:30-57.
- Kaur C, Hao AJ, Wu CH, Ling EA. 2001. Origin of microglia. *Microsc Res Tech*, 54 (1):2-9.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. 2011. Physiology of microglia. *Physiol Rev*, 91 (2):461-553.
- Kierdorf K, Prinz M. 2013. Factors regulating microglia activation. *Front Cell Neurosci*, 7:44.
- Kierdorf K, Prinz M. 2017. Microglia in steady state. *J Clin Invest*, 127 (9):3201-3209.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Holscher C, Muller DN, Luckow B, Brouwer T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M. 2013. Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci*, 16 (3):273-280.
- Kitamura T, Miyake T, Fujita S. 1984. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J Comp Neurol*, 226 (3):421-433.
- Klein D, Patzko A, Schreiber D, van Hauwermeiren A, Baier M, Groh J, West BL, Martini R. 2015. Targeting the colony stimulating factor 1 receptor alleviates two forms of Charcot-Marie-Tooth disease in mice. *Brain*, 138 (Pt 11):3193-3205.
- Kokona D, Ebner A, Escher P, Zinkernagel MS. 2018. Colony-stimulating factor 1 receptor inhibition prevents disruption of the blood-retina barrier during chronic inflammation. *J Neuroinflammation*, 15 (1):340.
- Koso H, Tsuchida A, Lai CY, Baba Y, Otsu M, Ueno K, Nagasaki M, Suzuki Y, Watanabe S. 2016. Conditional rod photoreceptor ablation reveals Sall1 as a microglial marker and regulator of microglial morphology in the retina. *Glia*, 64 (11):2005-2024.
- Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, 19 (8):312-318.

- Krishnamurthy J, Torrice C, Ramsey MR, Kovalev GI, Al-Regaiey K, Su L, Sharpless NE. 2004. Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J Clin Invest*, 114 (9):1299-1307.
- Kullberg S, Aldskogius H, Ulfhake B. 2001. Microglial activation, emergence of ED1-expressing cells and clusterin upregulation in the aging rat CNS, with special reference to the spinal cord. *Brain Res*, 899 (1-2):169-186.
- Kur J, Newman EA, Chan-Ling T. 2012. Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res*, 31 (5):377-406.
- Lavin Y, Winter D, Blecher-Gonen R, David E, Keren-Shaul H, Merad M, Jung S, Amit I. 2014. Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment. *Cell*, 159 (6):1312-1326.
- Lawson LJ, Perry VH, Gordon S. 1992. Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 48 (2):405-415.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. 1990. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, 39 (1):151-170.
- Lee CK, Weindruch R, Prolla TA. 2000. Gene-expression profile of the ageing brain in mice. *Nat Genet*, 25 (3):294-297.
- Lee JE, Liang KJ, Fariss RN, Wong WT. 2008. Ex vivo dynamic imaging of retinal microglia using time-lapse confocal microscopy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 49 (9):4169-4176.
- Letiembre M, Hao W, Liu Y, Walter S, Mihaljevic I, Rivest S, Hartmann T, Fassbender K. 2007. Innate immune receptor expression in normal brain aging. *Neuroscience*, 146 (1):248-254.
- Lewis PD. 1968. The fate of the subependymal cell in the adult rat brain, with a note on the origin of microglia. *Brain*, 91 (4):721-736.
- Li AC, Guidez FR, Collier JG, Glass CK. 1998. The macrosialin promoter directs high levels of transcriptional activity in macrophages dependent on combinatorial interactions between PU.1 and c-Jun. *J Biol Chem*, 273 (9):5389-5399.
- Li Y, Du XF, Liu CS, Wen ZL, Du JL. 2012. Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Dev Cell*, 23 (6):1189-1202.
- Ling EA, Wong WC. 1993. The Origin and Nature of Ramified and Ameboid Microglia - a Historical Review and Current Concepts. *Glia*, 7 (1):9-18.
- Ling EA, Penney D, Leblond CP. 1980. Use of Carbon Labeling to Demonstrate the Role of Blood Monocytes as Precursors of the Ameboid Cells Present in the Corpus-Callosum of Postnatal Rats. *Journal of Comparative Neurology*, 193 (3):631-657.
- Lopes KO, Sparks DL, Streit WJ. 2008. Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. *Glia*, 56 (10):1048-1060.
- Lu T, Pan Y, Kao SY, Li C, Kohane I, Chan J, Yankner BA. 2004. Gene regulation and DNA damage in the ageing human brain. *Nature*, 429 (6994):883-891.
- Lund H, Pieber M, Parsa R, Han J, Grommisch D, Ewing E, Kular L, Needhamsen M, Espinosa A, Nilsson E, Overby AK, Butovsky O, Jagodic M, Zhang XM, Harris RA. 2018. Competitive repopulation of an empty microglial niche yields functionally distinct subsets of microglia-like cells. *Nat Commun*, 9 (1):4845.
- Luo XG, Ding JQ, Chen SD. 2010. Microglia in the aging brain: relevance to neurodegeneration. *Mol Neurodegener*, 5:12.
- Ma W, Cojocaru R, Gotoh N, Gieser L, Villasmil R, Cogliati T, Swaroop A, Wong WT. 2013. Gene expression changes in aging retinal microglia: relationship to

- microglial support functions and regulation of activation. *Neurobiol Aging*, 34 (10):2310-2321.
- Madeira MH, Boia R, Santos PF, Ambrosio AF, Santiago AR. 2015. Contribution of microglia-mediated neuroinflammation to retinal degenerative diseases. *Mediators Inflamm*, 2015:673090.
- Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J. 1998. Tangential migration of ameboid microglia in the developing quail retina: mechanism of migration and migratory behavior. *Glia*, 22 (1):31-52.
- Marin-Teva JL, Almendros A, Calvente R, Cuadros MA, Navascues J. 1999a. Proliferation of actively migrating ameboid microglia in the developing quail retina. *Anatomy and Embryology*, 200 (3):289-300.
- Marin-Teva JL, Calvente R, Cuadros MA, Almendros A, Navascues J. 1999b. Circumferential migration of ameboid microglia in the margin of the developing quail retina. *Glia*, 27 (3):226-238.
- Marin-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. 2004. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*, 41 (4):535-547.
- Masland RH. 2012. The neuronal organization of the retina. *Neuron*, 76 (2):266-280.
- McHugh D, Gil J. 2018. Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues. *J Cell Biol*, 217 (1):65-77.
- Mendiola AS, Cardona AE. 2018. The IL-1 β phenomena in neuroinflammatory diseases. *J Neural Transm (Vienna)*, 125 (5):781-795.
- Mildner A, Schlevogt B, Kierdorf K, Bottcher C, Erny D, Kummer MP, Quinn M, Bruck W, Bechmann I, Heneka MT, Priller J, Prinz M. 2011. Distinct and non-redundant roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 31 (31):11159-11171.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R. 2001. Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol*, 101 (3):249-255.
- Miyamoto A, Wake H, Moorhouse AJ, Nabekura J. 2013. Microglia and synapse interactions: fine tuning neural circuits and candidate molecules. *Front Cell Neurosci*, 7:70.
- Morrison HW, Filosa JA. 2013. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. *J Neuroinflammation*, 10:4.
- Mouton PR, Long JM, Lei DL, Howard V, Jucker M, Calhoun ME, Ingram DK. 2002. Age and gender effects on microglia and astrocyte numbers in brains of mice. *Brain Res*, 956 (1):30-35.
- Najafi AR, Crapser J, Jiang S, Ng W, Mortazavi A, West BL, Green KN. 2018. A limited capacity for microglial repopulation in the adult brain. *Glia*, 66 (11):2385-2396.
- Neumann H, Kotter MR, Franklin RJ. 2009. Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132 (Pt 2):288-295.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. 2005. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, 308 (5726):1314-1318.
- Njie EG, Boelen E, Stassen FR, Steinbusch HW, Borchelt DR, Streit WJ. 2012. Ex vivo cultures of microglia from young and aged rodent brain reveal age-related changes in microglial function. *Neurobiol Aging*, 33 (1):195 e191-112.
- O'Neil SM, Witcher KG, McKim DB, Godbout JP. 2018. Forced turnover of aged microglia induces an intermediate phenotype but does not rebalance CNS environmental cues driving priming to immune challenge. *Acta Neuropathol Commun*, 6 (1):129.

- Ogura K, Ogawa M, Yoshida M. 1994. Effects of ageing on microglia in the normal rat brain: immunohistochemical observations. *Neuroreport*, 5 (10):1224-1226.
- Olson JK, Miller SD. 2004. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*, 173 (6):3916-3924.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F, Maggi L, Scianni M, Panzanelli P, Giustetto M, Ferreira TA, Guiducci E, Dumas L, Ragozzino D, Gross CT. 2011. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science*, 333 (6048):1456-1458.
- Paques M, Simonutti M, Augustin S, Goupille O, El Mathari B, Sahel JA. 2010. In vivo observation of the locomotion of microglial cells in the retina. *Glia*, 58 (14):1663-1668.
- Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR, 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB. 2013. Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell*, 155 (7):1596-1609.
- Paschalis EI, Lei F, Zhou C, Kapoulea V, Dana R, Chodosh J, Vavvas DG, Dohlman CH. 2018. Permanent neuroglial remodeling of the retina following infiltration of CSF1R inhibition-resistant peripheral monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115 (48):E11359-E11368.
- Paterson JA, Privat A, Ling EA, Leblond CP. 1973. Investigation of glial cells in semithin sections. 3. Transformation of subependymal cells into glial cells, as shown by radioautography after 3 H-thymidine injection into the lateral ventricle of the brain of young rats. *J Comp Neurol*, 149 (1):83-102.
- Perez-Cerda F, Sanchez-Gomez MV, Matute C. 2015. Pio del Rio Hortega and the discovery of the oligodendrocytes. *Front Neuroanat*, 9:92.
- Perry VH, Matyszak MK, Fearn S. 1993. Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia*, 7 (1):60-67.
- Peters A, Josephson K, Vincent SL. 1991. Effects of Aging on the Neuroglial Cells and Pericytes within Area 17 of the Rhesus-Monkey Cerebral-Cortex. *Anatomical Record*, 229 (3):384-398.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pfaffl MW. 2004. Real-time RT-PCR Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum*.
- Pocock JM, Kettenmann H. 2007. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends Neurosci*, 30 (10):527-535.
- Prinz M, Jung S, Priller J. 2019. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell*, 179 (2):292-311.
- Provis JM, Penfold PL, Edwards AJ, van Driel D. 1995. Human retinal microglia: expression of immune markers and relationship to the glia limitans. *Glia*, 14 (4):243-256.
- Rabinowitz SS, Gordon S. 1991. Macrosialin, a macrophage-restricted membrane sialoprotein differentially glycosylated in response to inflammatory stimuli. *J Exp Med*, 174 (4):827-836.
- Raivich G, Bohatschek M, Kloss CU, Werner A, Jones LL, Kreutzberg GW. 1999. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res Brain Res Rev*, 30 (1):77-105.
- Ransohoff RM, Cardona AE. 2010. The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, 468 (7321):253-262.

- Rashid K, Akhtar-Schaefer I, Langmann T. 2019. Microglia in Retinal Degeneration. *Front Immunol*, 10:1975.
- Reichenbach A, Bringmann A. 2019. Glia of the human retina. *Glia*.
- Reu P, Khosravi A, Bernard S, Mold JE, Salehpour M, Alkass K, Perl S, Tisdale J, Possnert G, Druid H, Frisen J. 2017. The Lifespan and Turnover of Microglia in the Human Brain. *Cell Rep*, 20 (4):779-784.
- Rezaie P, Male D. 2002. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci*, 11 (4):325-374.
- Rodriguez-Callejas JD, Fuchs E, Perez-Cruz C. 2016. Evidence of Tau Hyperphosphorylation and Dystrophic Microglia in the Common Marmoset. *Front Aging Neurosci*, 8:315.
- Rogers JT, Morganti JM, Bachstetter AD, Hudson CE, Peters MM, Grimmig BA, Weeber EJ, Bickford PC, Gemma C. 2011. CX3CR1 deficiency leads to impairment of hippocampal cognitive function and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 31 (45):16241-16250.
- Rufini A, Tucci P, Celardo I, Melino G. 2013. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene*, 32 (43):5129-5143.
- Safaiyan S, Kannaiyan N, Snaidero N, Brioschi S, Biber K, Yona S, Edinger AL, Jung S, Rossner MJ, Simons M. 2016. Age-related myelin degradation burdens the clearance function of microglia during aging. *Nat Neurosci*, 19 (8):995-998.
- Saijo K, Glass CK. 2011. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 11 (11):775-787.
- Salter MW, Stevens B. 2017. Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*, 23 (9):1018-1027.
- Sanchez-Lopez A, Cuadros MA, Calvente R, Tassi M, Marin-Teva JL, Navascues J. 2004. Radial migration of developing microglial cells in quail retina: a confocal microscopy study. *Glia*, 46 (3):261-273.
- Sanchez JMS, DePaula-Silva AB, Doty DJ, Truong A, Libbey JE, Fujinami RS. 2019. Microglial cell depletion is fatal with low level picornavirus infection of the central nervous system. *J Neurovirol*, 25 (3):415-421.
- Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martin-Oliva D, Marin-Teva JL, Navascues J, Cuadros MA. 2008. Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol*, 506 (2):224-239.
- Schafer DP, Lehrman EK, Stevens B. 2013. The "quad-partite" synapse: microglia-synapse interactions in the developing and mature CNS. *Glia*, 61 (1):24-36.
- Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B. 2012. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron*, 74 (4):691-705.
- Schuitemaker A, van der Doef TF, Boellaard R, van der Flier WM, Yaqub M, Windhorst AD, Barkhof F, Jonker C, Kloet RW, Lammertsma AA, Scheltens P, van Berckel BN. 2012. Microglial activation in healthy aging. *Neurobiol Aging*, 33 (6):1067-1072.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F. 2012. A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science*, 336 (6077):86-90.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D. 1993. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*, 366 (6456):704-707.

- Shankaran M, Marino ME, Busch R, Keim C, King C, Lee J, Killion S, Awada M, Hellerstein MK. 2007. Measurement of brain microglial proliferation rates in vivo in response to neuroinflammatory stimuli: application to drug discovery. *J Neurosci Res*, 85 (11):2374-2384.
- Sharpless NE, Sherr CJ. 2015. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*, 15 (7):397-408.
- Sheffield LG, Berman NE. 1998. Microglial expression of MHC class II increases in normal aging of nonhuman primates. *Neurobiol Aging*, 19 (1):47-55.
- Shemer A, Grozovski J, Tay TL, Tao J, Volaski A, Suss P, Ardura-Fabregat A, Gross-Vered M, Kim JS, David E, Chappell-Maor L, Thielecke L, Glass CK, Cornils K, Prinz M, Jung S. 2018. Engrafted parenchymal brain macrophages differ from microglia in transcriptome, chromatin landscape and response to challenge. *Nat Commun*, 9 (1):5206.
- Sheng JG, Mrak RE, Griffin WST. 1998. Enlarged and phagocytic, but not primed, interleukin-1 alpha-immunoreactive microglia increase with age in normal human brain. *Acta Neuropathologica*, 95 (3):229-234.
- Sholl DA. 1953. Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. *J Anat*, 87 (4):387-406.
- Sierra A, Gottfried-Blackmore AC, McEwen BS, Bulloch K. 2007. Microglia derived from aging mice exhibit an altered inflammatory profile. *Glia*, 55 (4):412-424.
- Sierra A, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Encinas JM, Comeau S, Tremblay ME. 2014. Surveillance, phagocytosis, and inflammation: how never-resting microglia influence adult hippocampal neurogenesis. *Neural Plast*, 2014:610343.
- Sierra A, de Castro F, Del Rio-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. 2016. The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, 64 (11):1801-1840.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M. 2010. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, 7 (4):483-495.
- Silverman SM, Wong WT. 2018. Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci*, 4:45-77.
- Simard AR, Rivest S. 2004. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *Faseb Journal*, 18 (6):998-+.
- Simard AR, Soulet D, Gowing G, Julien JP, Rivest S. 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49 (4):489-502.
- Singaravelu J, Zhao L, Fariss RN, Nork TM, Wong WT. 2017. Microglia in the primate macula: specializations in microglial distribution and morphology with retinal position and with aging. *Brain Struct Funct*, 222 (6):2759-2771.
- Sloane JA, Hollander W, Moss MB, Rosene DL, Abraham CR. 1999. Increased microglial activation and protein nitration in white matter of the aging monkey. *Neurobiol Aging*, 20 (4):395-405.
- Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, Zhang Y, Spevak W, Lin J, Phan NY, Habets G, Rymar A, Tsang G, Walters J, Nespi M, Singh P, Broome S, Ibrahim P, Zhang C, Bollag G, West BL, Green KN. 2019. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun*, 10 (1):3758.

- Spittau B. 2017. Aging Microglia-Phenotypes, Functions and Implications for Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*, 9:194.
- Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S. 2014. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep*, 8 (5):1271-1279.
- Stence N, Waite M, Dailey ME. 2001. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*, 33 (3):256-266.
- Stojilkovic MR, Ain Q, Bondeva T, Heller R, Schmeer C, Witte OW. 2019. Phenotypic and functional differences between senescent and aged murine microglia. *Neurobiol Aging*, 74:56-69.
- Stopper L, Balseanu TA, Catalin B, Rogoveanu OC, Mogoanta L, Scheller A. 2018. Microglia morphology in the physiological and diseased brain - from fixed tissue to in vivo conditions. *Rom J Morphol Embryol*, 59 (1):7-12.
- Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I. 2020. Dystrophic microglia in late-onset Alzheimer's disease. *Glia*, 68 (4):845-854.
- Streit WJ, Sammons NW, Kuhns AJ, Sparks DL. 2004. Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, 45 (2):208-212.
- Streit WJ, Braak H, Xue QS, Bechmann I. 2009. Dystrophic (senescent) rather than activated microglial cells are associated with tau pathology and likely precede neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 118 (4):475-485.
- Streit WJ, Xue QS, Tischer J, Bechmann I. 2014. Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun*, 2:142.
- Tap WD, Wainberg ZA, Anthony SP, Ibrahim PN, Zhang C, Healey JH, Chmielowski B, Staddon AP, Cohn AL, Shapiro GI, Keedy VL, Singh AS, Puzanov I, Kwak EL, Wagner AJ, Von Hoff DD, Weiss GJ, Ramanathan RK, Zhang J, Habets G, Zhang Y, Burton EA, Visor G, Sanftner L, Severson P, Nguyen H, Kim MJ, Marimuthu A, Tsang G, Shellooe R, Gee C, West BL, Hirth P, Nolop K, van de Rijn M, Hsu HH, Peterfy C, Lin PS, Tong-Starksen S, Bollag G. 2015. Structure-Guided Blockade of CSF1R Kinase in Tenosynovial Giant-Cell Tumor. *N Engl J Med*, 373 (5):428-437.
- Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay ME. 2017a. Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol*, 595 (6):1929-1945.
- Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernandez-Klett F, Lin G, Sagar, Datta M, Drougard A, Stempf T, Ardura-Fabregat A, Staszewski O, Margineanu A, Sporbert A, Steinmetz LM, Pospisilik JA, Jung S, Priller J, Grun D, Ronneberger O, Prinz M. 2017b. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat Neurosci*, 20 (6):793-803.
- Tischer J, Krueger M, Mueller W, Staszewski O, Prinz M, Streit WJ, Bechmann I. 2016. Inhomogeneous distribution of Iba-1 characterizes microglial pathology in Alzheimer's disease. *Glia*, 64 (9):1562-1572.
- Tremblay ME, Lowery RL, Majewska AK. 2010. Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol*, 8 (11):e1000527.
- Tremblay ME, Zettel ML, Ison JR, Allen PD, Majewska AK. 2012. Effects of aging and sensory loss on glial cells in mouse visual and auditory cortices. *Glia*, 60 (4):541-558.
- Trepel M. 2008. *Neuroanatomie Struktur und Funktion*. 4 Aufl. München: Elsevier.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T, Nakamura Y, Kikuta J, Ishii M, Yamashita T. 2013. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nat Neurosci*, 16 (5):543-551.
- Ulfig N. 2009. *Kurzlehrbuch Embryologie*. 2 Aufl. Stuttgart: Thieme.

- VanGuilder HD, Bixler GV, Brucklacher RM, Farley JA, Yan H, Warrington JP, Sonntag WE, Freeman WM. 2011. Concurrent hippocampal induction of MHC II pathway components and glial activation with advanced aging is not correlated with cognitive impairment. *Journal of Neuroinflammation*, 8.
- Varvel NH, Grathwohl SA, Baumann F, Liebig C, Bosch A, Brawek B, Thal DR, Charo IF, Heppner FL, Aguzzi A, Garaschuk O, Ransohoff RM, Jucker M. 2012. Microglial repopulation model reveals a robust homeostatic process for replacing CNS myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 (44):18150-18155.
- von Bernardi R, Eugenin-von Bernardi L, Eugenin J. 2015. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, 7:124.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J. 2009. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci*, 29 (13):3974-3980.
- Walker FR, Beynon SB, Jones KA, Zhao Z, Kongsui R, Cairns M, Nilsson M. 2014. Dynamic structural remodelling of microglia in health and disease: a review of the models, the signals and the mechanisms. *Brain Behav Immun*, 37:1-14.
- Wang M, Wang X, Zhao L, Ma W, Rodriguez IR, Fariss RN, Wong WT. 2014. Macrogliamicroglia interactions via TSPO signaling regulates microglial activation in the mouse retina. *J Neurosci*, 34 (10):3793-3806.
- Wang MH, Ma WX, Zhao L, Fariss RN, Wong WT. 2011. Adaptive Muller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *Journal of Neuroinflammation*, 8.
- Wang X, Zhao L, Zhang J, Fariss RN, Ma W, Kretschmer F, Wang M, Qian HH, Badea TC, Diamond JS, Gan WB, Roger JE, Wong WT. 2016. Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *J Neurosci*, 36 (9):2827-2842.
- Wheeler DL, Sariol A, Meyerholz DK, Perlman S. 2018. Microglia are required for protection against lethal coronavirus encephalitis in mice. *J Clin Invest*, 128 (3):931-943.
- Wohl SG, Schmeer CW, Friese T, Witte OW, Isenmann S. 2011. In situ dividing and phagocytosing retinal microglia express nestin, vimentin, and NG2 in vivo. *PLoS One*, 6 (8):e22408.
- Wong AM, Patel NV, Patel NK, Wei M, Morgan TE, de Beer MC, de Villiers WJ, Finch CE. 2005. Macsialin increases during normal brain aging are attenuated by caloric restriction. *Neurosci Lett*, 390 (2):76-80.
- Wong WT. 2013. Microglial aging in the healthy CNS: phenotypes, drivers, and rejuvenation. *Front Cell Neurosci*, 7:22.
- Xie Z, Morgan TE, Rozovsky I, Finch CE. 2003. Aging and glial responses to lipopolysaccharide in vitro: greater induction of IL-1 and IL-6, but smaller induction of neurotoxicity. *Experimental Neurology*, 182 (1):135-141.
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. 1993. P21 Is a Universal Inhibitor of Cyclin Kinases. *Nature*, 366 (6456):701-704.
- Yamada J, Jinno S. 2013. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *J Comp Neurol*, 521 (5):1184-1201.
- Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Coteleur AC, Kidd G, Zorlu MM, Sun N, Hu W, Liu L, Lee JC, Taylor SE, Uehlein L, Dixon D, Gu J, Floruta CM, Zhu M, Charo IF, Weiner HL, Ransohoff RM. 2014. Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J Exp Med*, 211 (8):1533-1549.

- Yang G, Chen L, Gao Z, Wang Y. 2018. Implication of microglia activation and CSF-1/CSF-1R pathway in lumbar disc degeneration-related back pain. *Mol Pain*, 14:1744806918811238.
- Yang P, Das PK, Kijlstra A. 2009. Localization and characterization of immunocompetent cells in the human retina. *Ocular Immunology and Inflammation*, 8 (3):149-157.
- Ye SM, Johnson RW. 1999. Increased interleukin-6 expression by microglia from brain of aged mice. *Journal of Neuroimmunology*, 93 (1-2):139-148.
- Yoshida S, Yashar BM, Hiriyanna S, Swaroop A. 2002. Microarray analysis of gene expression in the aging human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (8):2554-2560.
- Zhan L, Krabbe G, Du F, Jones I, Reichert MC, Telpoukhovskaia M, Kodama L, Wang C, Cho SH, Sayed F, Li Y, Le D, Zhou Y, Shen Y, West B, Gan L. 2019. Proximal recolonization by self-renewing microglia re-establishes microglial homeostasis in the adult mouse brain. *PLoS Biol*, 17 (2):e3000134.
- Zhang Y, Zhao L, Wang X, Ma W, Lazere A, Qian HH, Zhang J, Abu-Asab M, Fariss RN, Roger JE, Wong WT. 2018. Repopulating retinal microglia restore endogenous organization and function under CX3CL1-CX3CR1 regulation. *Sci Adv*, 4 (3):eaap8492.

10 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der vielfältigen Funktionen von Mikroglia.	6
Abbildung 2: Schematische Darstellung der retinalen Schichten anhand ihrer zellulären Komponenten.	10
Abbildung 3: Darstellung der Tierbehandlungen und Tötungszeitpunkte.....	22
Abbildung 4: Darstellung der Schnittführung durch die Retina und die Verteilung der Schnitte auf den Objektträgern	24
Abbildung 5: Übersichtsaufnahme der Retina.	26
Abbildung 6: Schematische Darstellung einiger morphologischer Parameter.	28
Abbildung 7: Darstellung der Volumenbestimmung durch die Filament Convex Hull Funktion.	29
Abbildung 8: RNA-Integrity Score (RIS) Gel der genutzten Proben.....	31
Abbildung 9: Verteilung und Morphologie von Mikroglia innerhalb der retinalen Schichten.	33
Abbildung 10: Anzahl und Verteilung der Mikroglia.	36
Abbildung 11: Analyse der mikroglialen Morphologie in der Zentralregion.	40
Abbildung 12: Graphische Darstellung der Sholl-Analyse.	42
Abbildung 13: Vergleich zwischen Zentralregion und Peripherie.....	44
Abbildung 14: Analyse der mikroglialen Morphologie in der Peripherie.	46
Abbildung 15: Vergleich der mikroglialen Morphologie zwischen Zentralregion und Peripherie innerhalb jeder Behandlungsgruppe.....	51
Abbildung 16: Graphische Darstellung der Sholl-Analyse im Vergleich der Zentralregion und Peripherie innerhalb jeder Behandlungsgruppe.....	53
Abbildung 17: Relative Expressionsraten der analysierten Gene	55
Abbildung 18: Relative Expressionsraten der analysierten Gene:	57
Abbildung 19: Darstellung des unterschiedlichen mikroglialen Ursprungs in der Retina	71

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien.	17
Tabelle 2: Laborgeräte.....	17
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien.	18
Tabelle 4: Tierfutter der Behandlungen.	19
Tabelle 5: Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie.....	19
Tabelle 6: Übersicht der eingesetzten Primer-Sequenzen zur qPCR-Analyse.	20
Tabelle 7: Softwareangaben.....	21

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

Prof. Dr. med. Otto W. Witte
Dr. Christian Schmeer, PhD

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere
Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion auf vielfältige Art und Weise unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Otto W. Witte für die Bereitstellung des interessanten Promotionsthemas und die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit in der Experimentellen Neurologie am Forschungszentrum Lobeda.

Herrn Dr. Christian Schmeer danke ich für die freundliche und kontinuierliche Betreuung und Unterstützung der gesamten Arbeit sowie die stetige Erreichbarkeit.

Mein besonderer Dank gilt Julia Lindner für ihre engagierte Unterstützung im Labor und die vielen Ratschläge und konstruktiven Diskussionen. Vielen Dank für das stets offene Ohr bei allen Fragen und Problemen.

Auch danke ich Lars Schmidl für die stete Hilfsbereitschaft bei technischen Problemen und die Einführung in die LSM-Mikroskopie.

Allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Experimentellen Neurologie danke ich für ihre kollegiale und hilfsbereite Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei Herrn Dr. Thomas Lehmann für die kompetente Beratung in der statistischen Auswertung.

Dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) danke ich für die großzügige Unterstützung durch das Promotionsstipendium, welches mir ermöglichte, mich intensiv der Labortätigkeit zu widmen.

Zu guter Letzt danke ich herzlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich während meiner gesamten Promotionszeit liebevoll unterstützt und motiviert sowie für den nötigen Ausgleich gesorgt haben.